

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Cambios epigenéticos inducidos por el  
envejecimiento en el oocito de ratón**

*Iris Mercedes Manosalva Peña.*

*Universidad Autónoma de Madrid. Centro de Investigaciones Biológicas  
(CSIC).*

*Director: Pedro Esponda*

*Co-directora: Clara Goday*

*Tutor: Jaime Gosálvez*

*Madrid, 10 de Marzo de 2008*

***A mi familia,***

*Juanita y Julio por su apoyo incondicional*

*Y a mi querido Aitor por ser mi inspiración*

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradezco al Programa Alban por haberme brindado la oportunidad de poder realizar mis estudios de doctorado a través de una de sus becas.

Y en forma personal quiero expresar mis agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr Pedro Esponda, director de mi tesis, por brindarme la oportunidad de hacer mi tesis en su laboratorio y por apoyarme cuando lo necesité.

A Clara Goday, codirectora de mi tesis, por su ayuda durante la realización de mi tesis.

Al Dr Jaime Gosálvez, tutor de mi tesis por haber aceptado ser mi tutor.

A Ascensión por ser una amiga siempre dispuesta a escucharme y ayudarme en mis asuntos personales.

A Juan por apoyarme con su serenidad en la última etapa de mi tesis.

A mis nuevas amigas que quiero mucho Mari Carmen y Ana gracias por estar aquí ahora alegran mis días.

A las integrantes del grupo del confocal Maite y Silvia gracias por su apoyo.

A los integrantes del grupo del animalario en especial a Manolo por brindarme todos los animales que necesité.

A mis vecinos de laboratorio, Lucas Sánchez, José Luís Díez, José Luís Barbero, Luisa Botella, Nandi, Iker, Mercedes, por haberme aportado en algún momento su apoyo.

A mis amigos en Madrid que fuera del laboratorio acompañaron mis días, Carmen, Jaime, Alberto, Celso, Karim, Christian, Abel, Verónica, Pili, Juan Carlos y en especial a mi mejor amiga Antonia, con la cual pude compartir muchos momentos (a veces felices y a veces no tanto) durante la realización de esta tesis, gracias por haber estado allí y seguir estándolo.

A Patricia por ser una amiga incondicional que siempre me apoyo con los

experimentos de esta tesis, sus buenos consejos, sus ideas y sobre todo por nuestras reconfortantes charlas.

A mi nueva familia Javier, Saioa, Iratxe y en especial a Marivi por hacerme sentir como un miembro más de vuestro hogar.

A mis padres que me apoyaron siempre y sobre todo porque los sentí cerca de mí a pesar de la distancia.

Dejo la mejor parte para el final, agradezco de forma muy especial a Aitor, por darme tan buenas ideas, nuestras largas discusiones, sus buenos consejos, su apoyo incondicional y sobre todo por su cariño que me dio fuerza para terminar esta tesis.

## RESUMEN

En esta Tesis se han estudiado algunas alteraciones del gameto femenino de mamíferos causadas por la vejez. Este estudio se realizó especialmente enfocado a analizar los cambios en la cromatina por efecto del envejecimiento en oocitos. La mayoría de los estudios sobre envejecimiento en oocitos se han realizado en condiciones *in vitro*, por ello aquí se ha estudiado principalmente el efecto de la vejez natural. Se empleó el ratón como un modelo y se estudiaron los oocitos en los estadios de vesícula germinativa (VG) y metafase II (MII), los cuales se colectaron tanto de hembras jóvenes (3-4 meses de edad) como de viejas (13-17 meses de edad). Los resultados mostraron que ocurren una serie de alteraciones en el patrón de metilación y acetilación de las histonas presentes en la cromatina del oocito envejecido. Se observó una marcación positiva en VG y MII de hembras jóvenes cuando se emplearon anticuerpos que reconocían metilación de la histona H3 en la *Lys9* (H3K9me2, H3K9me3), *Lys4* (H3K4me2), *Lys36* (H3K36me2), *Lys79* (H3K79me2) y H4 en la *Lys20* (H4K20me). Sin embargo, VG viejas mostraron alteraciones en la metilación de histonas. Estas alteraciones correspondían a una ausencia en la metilación de H3K9me3, H4K20me2, H3K36me2 y H3K79me2. Asimismo, se apreció una disminución en los niveles de la metilación en H3K9me2 y H3K4me2. Oocitos en MII viejos también mostraron una disminución en el porcentaje de metilación de las histonas H3K9me2, H3K9me3, H3K4me2, H4K20me2, H3K36me2 y H3K79me2. Por otra parte, en VG jóvenes la acetilación de la histona H4 en la *Lys8* (H4K8ac), *Lys5* (H4K5ac), *Lys12* (H4K12ac) y *Lys16* (H4K16ac) se observó en VG pero no apareció en MII. Mientras que, VG viejas mostraron diferencia en los niveles de H4K8ac, H4K5ac, H4K12ac, H4K16ac y una ausencia en la acetilación H4K12ac y H4K16ac, MII viejos no mostraron diferencia entre jóvenes y viejos con excepción de la acetilación en H4K12ac donde ésta estuvo presente. Debido a que detectamos alteraciones en las modificaciones de histonas quisimos observar si estos cambios estaban relacionadas con algunas proteínas específicas

relacionadas con ellas. Para ello se eligió la SIR2 relacionada con H4K16ac y la HP1 $\beta$  proteína relacionada con la metilación de histona H3 en la histona 9. En oocitos de hembras viejas se observó una disminución de estas proteínas. Teniendo en cuenta que la acetilación de la histona H4K12ac está asociada con la expresión de *Cdc2a* durante la maduración del oocito, analizamos la presencia de dicha proteína en los diferentes casos estudiados. *Cdc2a* es una proteína importante que participa en el reinicio de la meiosis. Empleando RT-PCR se observó que existía un aumento en la expresión de *Cdc2a* en VG viejas. Además se observó que mediante inmunofluorescencia se observó que existía una disminución en los niveles de esta proteína. Así como también, se detectó que existía una disminución de la actividad kinasa de esta proteína. Dado que las condiciones de cultivo para los oocitos producen diversos cambios en el gameto, analizamos la incidencia de dicha condición. Se observó que oocitos viejos en cultivo presentaban un aumento de la acetilación en MII y una disminución de la proteína *Cdc2a*. Teniendo en cuenta que la maquinaria de acetilación está controlada por las deacetilasas, y ya que en VG de hembras viejas esta maquinaria se encuentra alterada, se inhibió la actividad de estas enzimas para conocer su participación en esta alteración. Los resultados mostraron que después de la inhibición de deacetilasas, aparecía una acetilación de H4K12ac tanto en oocitos jóvenes como viejos. Además, la proteína *Cdc2a* aparecía aumentada en oocitos viejos. Empleando la inhibición de deacetilasas se pretendió revertir el efecto que tiene la vejez sobre la acetilación de la Histona H4 en la lisina12 y sobre la presencia de la proteína *Cdc2a*. Para ello, se inhibió la deacetilación por un periodo corto. Los resultados mostraron que aparecían oocitos viejos en MII deacetilados (igual que jóvenes en MII) y con un incremento del porcentaje de *Cdc2a*. Esto mostró que, al menos en estos aspectos, se podía revertir el envejecimiento. Teniendo en cuenta el papel importante que poseen las células del cumulus oophorus sobre la maduración del oocito, se estudió el grado de apoptosis ocurrido en estas células en el caso de hembras viejas. Los resultados obtenidos mediante la técnica del Túnel y las de microscopía electrónica mostraron un mayor porcentaje (40%) de células del cúmulo en apoptosis por efecto de la vejez. Los resultados obtenidos permiten concluir que el envejecimiento provoca una serie de alteraciones en algunos factores epigenéticos de la cromatina del oocito en estadios de VG y MII. Además, provoca una disminución de la

expresión de algunos genes, como el Cdc2a relacionada con la acetilación de H4K12ac. Por otro lado, se demostró como una inhibición de las deacetilasas puede revertir el efecto provocado por el envejecimiento. Las modificaciones observadas en la metilación/acetilación de histonas sugieren probables modificaciones en la remodelación de la cromatina por efecto del envejecimiento, lo cual podría alterar ciertos genes que controlan la meiosis y que en consecuencia causar alteraciones en el estadio de MI.

## SUMMARY

In this Thesis, we have analyzed the molecular changes in the chromatin of the mammalian female gametes occurred due to aging. The oocytes were collected from young females (3-4 month old) and old females (13-17 month old). We have studied gene expression and epigenetic changes in the chromatin of old oocytes. Previous works about aging in oocytes were carried out mainly *in vitro*, so we have focused this research on natural aging. Using mice as a model system, oocytes were examined at different stages of oogenesis as germinal vesicle (GV) and metaphase II (MII). The analysis of methylation in young females during GV and MII showed methylation of the histone H3 in the *Lys9* (H3K9me2, H3K9me3), *Lys4* (H3K4me2), *Lys36* (H3K36me2), *Lys79* (H3K79me2) and histone H4 in the *Lys20* (H4K20me2). By contrast, old GV did not show methylation in H3K9me3, H4K20me2 H3K36me2 and H3K79me2. Moreover, the levels of methylation in H3K9me2 and H3K4me2 were lower than in young GV oocytes. In MII, the percentage of oocytes positive for methylation was significantly lower than in young oocytes. We also examined acetylation in lysine residues of histone proteins. In young GV oocytes, the histone H4 in the *Lys8* (H4K8ac), *Lys5* (H4K5ac), *Lys12* (H4K12ac) and *Lys16* (H4K16ac) were acetylated. This contrasts with old GV oocytes, where the levels of H4K18ac, H4K5ac, H4K12ac, H4K16ac were different and the absence of H4K12ac and H4K16ac was observed. During MII stage acetylation was not observed in both young and old oocytes, with the exception of H4K12ac, which shows a positive immunostaining. We also examined the protein SIR2 that is related to H4K16ac; and Hp1 $\beta$  a protein related to H3K9me2. Both proteins were present in young and old oocytes, though their levels were lower in old GV oocytes. In the case of H4K12ac, this acetylation has been related to Cdc2a, a component of the Maturing Promoting Factor. Using RT-PCR we observed increase in the expression of *Cdc2a* in old GV. Surprisingly, the protein Cdc2a and its kinase activity were decreased during this stage. Employing *in vitro* techniques we observed that maturation of aging oocytes show an increase of H4K12ac and decrease of the protein Cdc2a. We also used the deacetylase inhibitor TSA and observed hyperacetylation in both old and young oocytes. This agrees with previous reports that acetylation during



oocyte maturation is controlled by deacetylases. Under this condition, the protein Cdc2a was increased in old oocytes. Moreover, we attempted to reverse the aging phenotype of the oocytes. If the lower acetylation of H4K12 in old GV stage may be the cause of the hyperacetylation observed at MII stage, then we induced hiperacetylation using a short treatment with TSA in old GV stage. Results showed that in old oocytes, H4K12ac acetylation decreased at MII stage and Cdc2a appeared increased, as observed in young oocytes. Used the TUNEL method, apoptosis was measured in the cumulus oophorus cells during the oocyte maturation process in old females. This experiment showed an apoptotic increase of a 40% in the cumulus cells collected from old females. This result was confirmed by electron microscopy.

We can conclude that aging generate epigenetic alterations of the chromatin of GV and MII oocytes. Furthermore, aging causes a decrease of gene expression as the *Cdc2a* who is related with H4K12ac. Also, we showed that inhibitions of deacetylases can reverse the effect of aging. The alterations in histone methylations/acetylations suggest that the chromatin might be altered in aging oocytes, which could result in aberrant gene expression. This would be the probable cause of an abnormal meiosis progression towards the MII stage.

## ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**Å:** Amstrong

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**BSA:** *bovine serum albumine*, seroalbúmina bovina

**°C:** grados centígrados

**cADN :** Acido desoxirribonucleio copia

**DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol

**dNTP:** desoxinucleótido trifosfato

**FITC:** *fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína

**g:** gramo

**hCG:** Hormona gonadotrofina coriónica humana

**HP:** *heterochromatin protein*, proteína heterocromática

**H<sub>2</sub>O:** agua

**H3K9:** lisina 9 de la histona H3

**l:** litro

**Lys:** Lisina

**M:** molar

**MII:** Estadio de Metafase II

**mg:** miligramo

**ml:** mililitro

**mM:** milimolar

**MPF:** Factor promotor de la maduración

**ng:** nanogramo

**OsO<sub>4</sub>:** Tetróxido de Osmio

**PBS:** tampón salino fosfato

**PCR:** *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

**PMSG:** Hormona gonadotrofina de suero de yegua preñada

**rpm:** revoluciones por minuto

**RNA<sub>m</sub>**: Acido ribonucleico mensajero

**RT**: retrotranscripción

***Tyr***: tirosina

***Trh***: Treonina

**TUNEL**: Terminal dUTP nick end labelling

**U**: unidad

**μg**: microgramo

**μl**: microlitro

**μM**: micromolar

**VG**: Estadio de vesícula germinativa

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>V</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1. ASPECTOS BÁSICOS DE LA MADURACIÓN DEL OOCITO .....	4
1.1 Foliculogénesis.....	4
1.2 El número de folículos disminuye con la edad.....	5
1.3 La oogénesis .....	6
1.3.1. Cromatina en estadio de vesícula germinativa.....	7
2. ENVEJECIMIENTO REPRODUCTIVO.....	7
2.1 Deficiencia neuroendocrina durante el envejecimiento.....	7
2.3 Efecto de la edad sobre la maduración de oocitos .....	8
3. EPIGÉNETICA Y MODIFICACIONES DE LA CROMATINA .....	11
3.1 Metilación y acetilación de histonas.....	12
4. VARIACIONES DE LA CROMATINA Y SU FUNCIÓN EN OOCITOS .....	13
5. METILACIÓN EN OOCITOS .....	13
6. ACETILACIÓN DE HISTONAS EN OOCITOS .....	14
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
1. ANIMALES.....	18
2. EXTRACCIÓN DE OOCITOS .....	18
3. INMUNOCITOQUÍMICA .....	19
4. ANÁLISIS DE LA INTENSIDAD DE LOS NIVELES DE FLUORESCENCIA.....	20
5. RT-PCR.....	20
6. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE VG .....	22
7. TRATAMIENTO CON TSA .....	22
8. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD KINASA.....	22
9. DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN LOS OOCITOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TUNEL.....	23
10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME) .....	24
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	26
12. REACTIVOS .....	26
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
1. DISTRIBUCIÓN DE LA CROMATINA EN OOCITOS DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS EN ESTADIO DE VESÍCULA GERMINATIVA (VG) .....	27
2. 29	
3. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA CROMATINA DE OOCITOS JÓVENES Y VIEJOS EN ESTADIO DE VG.....	30
4. METILACIÓN DE H3K9ME2, H3K9ME3, H4K20ME2, H3K36ME2 Y H3K79ME EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS .....	33
5. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA DE H3K9ME2 Y H3K4ME2 EN VG JÓVENES Y VIEJAS .....	36
6. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA DE H3K9ME2 Y H3K4ME2 EN VG DE HEMBRAS VIEJAS Y	

JÓVENES QUE PRESENTAN LA ORGANIZACIÓN DE CROMATINA NSN Y SN .....	37
7. METILACIÓN H3K9ME2, H3K9ME3, H3K4ME2, H3K20ME2, H3K36ME2 Y H3K79ME2 EN OOCITOS (MII) DE HEMBRAS VIEJAS.....	38
8. ACETILACIÓN DE LA HISTONA H4K12AC Y H4K16AC EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS VIEJAS. ....	39
9. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA H4K5AC Y H4K8AC EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS VIEJAS. 41	
10. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA H4K8AC Y H4K5AC EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS CON ORGANIZACIÓN DE CROMATINA SN Y NSN.....	41
11. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA H4K12AC Y H4K16AC EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS.....	42
12. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA H4K16AC Y H4K12AC EN OOCITOS (VG) CON LA ORGANIZACIÓN DE CROMATINA SN Y NSN DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS .....	43
13. ACETILACIÓN H4K5AC, H4K8AC, H4K12AC Y H4K16 EN OOCITOS (MII) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS .....	44
14. ACETILACIÓN H4K12AC EN OOCITOS (VG Y MII) DE HEMBRAS VIEJAS DE DIFERENTES EDADES. ....	46
15. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA DE LA PROTEÍNA HP1 $\beta$ EN VG DE HEMBRAS VIEJAS .....	46
16. NIVELES RELATIVOS DE FLUORESCENCIA DE LA PROTEÍNA SIR2 EN VG DE HEMBRAS VIEJAS .....	48
17. PRESENCIA DE RNAPOLII EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS.....	49
18. EXPRESIÓN DEL GEN <i>Cdc2A</i> EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS .....	51
19. EXPRESIÓN DEL GEN <i>Cdc2A</i> EN OOCITOS (MII) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS.....	52
20. ACTIVIDAD KINASA DE LA PROTEÍNA Cdc2A EN OOCITOS (VG) DE HEMBRAS VIEJAS .....	53
21. ACTIVIDAD KINASA EN OOCITOS (MII) DE HEMBRAS JÓVENES Y VIEJAS.....	54
22. ACETILACIÓN H4K12AC EN OOCITOS JÓVENES Y VIEJOS (MII) OBTENIDOS DE CULTIVOS DE VG.....	54
23. PROTEÍNA Cdc2A EN MII JÓVENES Y VIEJAS OBTENIDAS DE CULTIVOS DE VG.....	55
24. APOPTOSIS EN CÉLULAS DEL CUMULUS DE HEMBRAS VIEJAS. ....	56
25. EFECTO DE LA TRICOSTATINA A (TSA) SOBRE LA ACETILACIÓN H4K12 EN MII JÓVENES Y VIEJAS OBTENIDAS DE CULTIVOS DE VG.....	58
26. EFECTO DEL TSA SOBRE LA PRESENCIA DE LA PROTEÍNA Cdc2A EN MII JÓVENES Y VIEJAS OBTENIDAS DE CULTIVOS DE VG.....	58
27. EFECTO DEL TSA POR UNA HORA (1h) , EN MII JÓVENES Y VIEJAS OBTENIDAS DE CULTIVOS DE VG ....	59
28. EXPRESIÓN DEL GEN <i>Cdc2A</i> EN OOCITOS JÓVENES Y VIEJOS CULTIVADOS CON TSA .....	60
29. DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD KINASA EN OOCITOS JÓVENES Y VIEJOS CULTIVADOS CON TSA.....	61
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
1. DISTRIBUCIÓN DE LA CROMATINA DE OOCITOS DE HEMBRAS VIEJAS EN EL ESTADIO DE VESÍCULA GERMINATIVA.....	63
2. MODIFICACIONES DE LAS HISTONAS EN OOCITOS DE HEMBRAS VIEJAS DURANTE LOS ESTADIOS DE VESÍCULA GERMINATIVA Y METAFASE II. ....	65
3. LAS PROTEÍNAS HP1 $\beta$ Y SIR2 Y RNAPOL-II EN OOCITOS EN EL ESTADIO DE VESÍCULA GERMINATIVA DE HEMBRAS VIEJAS .....	69
4. LA PROTEÍNA Cdc2A EN OOCITOS DE HEMBRAS VIEJAS DURANTE LOS ESTADIOS DE VESÍCULA GERMINATIVA Y METAFASE II.....	70
5. ACETILACIÓN DE LA HISTONA H4 EN LA Lys12 Y PRESENCIA DE LA PROTEÍNA Cdc2A EN OOCITOS VIEJOS MADURADOS <i>IN VITRO</i> .....	73
6. ACETILACIÓN DE LA Lys12 EN LA HISTONA H4 Y PRESENCIA DE LA PROTEÍNA Cdc2A EN LOS OOCITOS MADURADOS <i>IN VITRO</i> TRATADOS CON TRICOSTATINA A.....	74
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>

## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un fenómeno natural que va gradualmente alterando la morfofisiología celular en la mayoría de las células y tejidos animales (Richardson and Cheung, 1982). A nivel reproductivo la edad afecta las tasas de fecundidad a través de la alteraciones hormonales y/o celulares. Estos factores inducen la vejez del aparato reproductor y de los gametos, que dependiendo de la especie culmina en una parcial o total infertilidad. Por ejemplo, en la especie humana, la fertilidad femenina óptima se mantiene desde la pubertad hasta los 35 años, y más tarde ocurre una aguda disminución de la condición fértil (Sauer, 1998). Esta progresión origina un sistema de control natural de la fecundidad en una población de individuos.

El ratón puede ser utilizado como modelo de estudio para los mamíferos debido a que los cambios originados por la vejez son relativamente similares a los de los humanos y la hembra disminuye gradualmente su fertilidad a partir de los 8 meses de vida.

La vida fértil del gameto femenino de mamíferos es relativamente corta si la comparamos con la del gameto masculino. En una hembra adulta de mamíferos, la gran mayoría de los oocitos se encuentran en el ovario detenidos en estadio de vesícula germinativa (VG). Periódicamente, algunos de éstos oocitos se reactivan y reinician su maduración meiótica hasta alcanzar el estadio de metafase II (MII) en el que son ovulados. Por efecto del envejecimiento el ovario produce oocitos en MII alterados. Se ha observado que los oocitos viejos en MII presentan tanto alteraciones fisiológicas (disminución de células del cúmulos, mayor activación partenogénica) como citológicas (disminución de gránulos corticales, retención de cromosomas, aumento de agregados mitocondriales) (Tarin et al., 2001), además de alteraciones del tipo genético (modificaciones en la expresión de genes relacionados con la maduración del oocito) (Hamatani et al., 2004). Los problemas mencionados anteriormente se podrían deber a que los oocitos se encuentran

detenidos desde el nacimiento hasta la vejez en VG, permaneciendo largo tiempo expuestos a determinados factores, siendo uno de ellos el proceso de envejecimiento. En relación a ello, se puede pensar que los oocitos viejos en MII se encuentran alterados como consecuencia de los cambios generados durante su prolongado estadio de VG. Para aclarar esta idea nos proponemos analizar los cambios ocurridos en la cromatina, así como la existencia de determinadas modificaciones epigenéticas de la misma.

A continuación, exponemos los aspectos básicos de la ovogénesis (maduración de oocitos desde el estadio de VG hasta MII); las principales consecuencias del envejecimiento sobre el oocito; algunos conceptos básicos de epigénesis incluyendo los tipos de modificaciones epigenéticas y los genes relacionados con dichas modificaciones.

## **1. Aspectos básicos de la maduración del oocito**

La reproducción sexual tiene como característica que cada sexo origina un tipo de gameto, los cuales deben encontrarse e interactuar durante la fecundación. La formación de los gametos depende de muchos factores como el correcto desarrollo del proceso meiótico y la diferenciación post-meiótica. La meiosis en la hembra de mamíferos presenta características muy particulares ya que desde el nacimiento los oocitos se detienen en meiosis I (VG). En este estado post-paquiténico, denominado también como dictioteno, los oocitos permanecen durante años según sea la duración de la vida reproductiva de la hembra (Ottolenghi et al., 2004). En la pubertad, algunos oocitos reinician la meiosis por el proceso conocido como “maduración del oocito” que se define como la transición entre la diacinesis de meiosis I y la metafase de meiosis II y esta acompañado de un reordenamiento nuclear.

### **1.1 Foliculogénesis**

Desde el nacimiento, el oocito está rodeado de células somáticas en una estructura

denominada folículo. Las células somáticas que rodean al oocito se conocen como células de la granulosa. Los folículos se forman durante la maduración meiótica temprana. Una serie de investigaciones han demostrado que el crecimiento y el desarrollo del oocito está estrechamente ligado a la actividad fisiológica de estas células somáticas (Patrizio et al., 2007). En la pubertad, los folículos primordiales (presentes desde el nacimiento) reinician su maduración folicular hasta convertirse en folículos primarios. Posteriormente, ocurre la formación de los folículos secundarios que se caracterizan por un aumento considerable de las capas de las células de la granulosa. En este momento, el oocito completa su crecimiento y alcanza su tamaño máximo (120  $\mu\text{m}$  en la mujer, 80  $\mu\text{m}$  en el ratón). Al continuar su desarrollo, los folículos, denominados folículos terciarios, expresan los receptores de la hormona luteinizante (Polanski et al.) y folículo estimulante (FSH) en las células de la teca interna y de la granulosa, respectivamente. Estas hormonas producen un aumento del volumen del folículo, así como la licuefacción de muchas células de la granulosa con aparición del antro folicular y como consecuencia ocurre la formación de un folículo pre-ovulatorio o de De Graaf. En esta estructura madura, las células de la granulosa que rodean al oocito se denominan células del cúmulus oophorus, mientras que aquellas más cercanas al oocito reciben el nombre de corona radiada. En este momento, el oocito se encuentra en estadio de Metafase II (MII), y por lo tanto apto para ser ovulado y fecundado.

## **1.2 El número de folículos disminuye con la edad**

Al nacer, los ovarios humanos contienen alrededor de dos millones de folículos detenidos en estadio primordial de desarrollo. A lo largo de la infancia y la etapa adulta, algunos de estos folículos primordiales van desarrollándose, mientras que otros sufren apoptosis y/o degeneran. Esto causa una progresiva disminución de la reserva folicular. Estudios realizados en ratones sugieren que la velocidad de depleción folicular esta inversamente relacionada con el número de folículos primordiales presentes en los ovarios (Ottolenghi et al., 2004). En el ser humano, la velocidad de depleción de los folículos



primordiales depende de la edad, pero es máxima durante la mitad del desarrollo fetal intrauterino cuando se pasa de 7-8 millones de células germinales en el quinto mes de gestación, al millón de folículos primordiales en el momento de nacer. Otra importante alteración ocurre en la pubertad. A partir de la menarquia, cuando el número de folículos es de 400 000, comienza una pérdida folicular de alrededor de 1000 folículos por mes. La depleción folicular se acelera con la edad aumentando exponencialmente a partir de los 35 años.

### **1.3 La oogénesis**

El fenómeno de oogénesis es el proceso de maduración mediante el cual una oogonia primordial se transforma en un oocito maduro. La oogénesis está vinculada con la meiosis de los gametos femeninos y empieza en la etapa embrio-fetal en mamíferos. Las oogonias que provienen de las oogonias primordiales se dividen en múltiples ocasiones y en un determinado momento entran en profase meiótica I, pasando entonces a convertirse en un oocito I. Esta conversión se reconoce también por un leve aumento del volumen y calidad del citoplasma, en el cual aumentan considerablemente los orgánulos, estructuras membranosas e inclusiones. Por otro lado, el núcleo del oocito sufre los primeros estadios de la profase meiótica y una vez alcanzado el diploteno se detiene en un estadio que algunos autores denominan como dictioteno (Zybina and Zybina, 1992). Todos estos procesos ocurren en el ovario embrionario de tal forma que en el momento del nacimiento todos los oocitos se encuentran en dictioteno. En general los oocitos que se observan en el ovario infantil y adulto y cuyo núcleo se encuentra en dictioteno reciben el nombre de vesícula germinativa (VG). Al llegar a la pubertad, y debido a los cambios en los niveles hormonales, los oocitos en VG reinician la meiosis periódicamente, finalizando la primera división meiótica y continúan hasta MII. En esta etapa, el oocito ovulado permanece en el oviducto hasta que eventualmente es fecundado, en cuyo caso finalizaría la segunda meiosis. Por otro lado, en hembras viejas al alcanzar cierta edad (alrededor de los 43 años

en la mujer, 10 meses en el ratón), los oocitos en dictioteno que no reinician la meiosis serían más susceptibles de ser alterados por efectos de la edad. Por ello, conocer el efecto del envejecimiento en oocitos en VG es clave para entender las aberraciones que aparecen en los oocitos envejecidos en estadio de MII.

### **1.3.1. Cromatina en estadio de vesícula germinativa**

La VG presenta dos tipos de organización de la cromatina de acuerdo a la terminología de Zuccotti (1998). Estos dos tipos son: oocitos con un anillo de cromatina compacta alrededor del nucléolo (SN: *Surrounding nucleoli*) y oocitos que carecen de anillo compacto alrededor del nucleolo (NSN: *Non surrounding nucleoli*). En algunos casos se ha sugerido la relación de estos estadios con la actividad fisiológica del gameto, así durante la maduración *in vitro*, se ha visto que sólo los oocitos SN originarán embriones que llegaran hasta el estadio de 2 células (Zuccotti et al., 1998). Además, es interesante mencionar que determinados genes, como es el caso de Hsp1, están activos en oocitos en NSN pero inactivos en los oocitos en SN (Christians et al., 1999). Por otro lado se sabe que la maduración de los oocitos SN requiere factores citoplasmáticos existentes en las células del cúmulus que forman el folículo antral (De La Fuente, 2006). Estas células del cúmulus (somáticas) están expuestas también al envejecimiento, y por ello existe la posibilidad que defectos ocurridos en éstas células induzcan, cambios en el oocito en VG.

## **2. Envejecimiento reproductivo**

### **2.1 Deficiencia neuroendocrina durante el envejecimiento**

El envejecimiento provoca una gran alteración del sistema reproductivo de la hembra.

A nivel de la regulación hormonal, el envejecimiento provoca una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, disminuyendo la secreción de la inhibina B, resultando en una reducción de la funcionalidad de los folículos y en consecuencia en un aumento de FSH y una disminución del estradiol. Los ciclos estrogénicos primero se vuelven irregulares y después cesan (Peluso et al., 1980). En el caso de la testosterona, sus niveles se mantienen a lo largo de la transición menopaúsica. Estas alteraciones hormonales producen además la pérdida de funcionalidad del útero y de los ovarios.

Esta alteración del útero con la edad se ha demostrado en varios casos, como en los experimentos que analizan la implantación de embriones jóvenes en hembras viejas y se evidencia una disminución de la eficiencia de implantación (Harman and Talbert, 1970). Además, de estos defectos en la pre-implantación, la respuesta del útero a las hormonas se retarda debido a una menor sensibilidad de este órgano a los esteroides (Peluso et al., 1980).

## **2.3 Efecto de la edad sobre la maduración de oocitos**

La disminución de la fertilidad en los oocitos viejos esta determinada, en gran parte, por una deficiente maduración meiótica. Aunque los oocitos viejos pueden completar el proceso de maduración y llegan a fecundar, el embrión que generan es muchas veces anormal (Armstrong, 2001; Eichenlaub-Ritter, 1998). Es por ello que una propuesta alternativa para mejorar la calidad de oocitos viejos ha sido la maduración *in vitro*. Sin embargo, se ha observado que durante la maduración *in vitro* también se producen determinadas alteraciones como la disminución de la formación del cuerpo polar, fragmentación y degeneración de los gametos en MII (Eppig and O'Brien, 1995; Peluso et al., 1980).

## 2.4 Efecto de la edad sobre los oocitos en estadio MII

Los efectos del envejecimiento en oocitos de mamíferos durante el estadio MII han sido extensamente estudiados, debido a que éste es el período en el que los gametos se encuentran maduros y aptos para ser fecundados. La disminución del número de oocitos en MII es la causa fundamental de la pérdida de la capacidad reproductiva por el envejecimiento (Adams, 1970; Peluso et al., 1980). Otra causa importante de infertilidad en mamíferos es la pérdida de calidad de los oocitos. Esta pérdida de calidad origina un gran aumento de la activación partenogenética (Liu et al., 1998; Moos et al., 1996), de la poliespermia (Peluso et al., 1980); así como de la aparición de un gran número de alteraciones cromosómicas (aneuploidias, poliploidias y desorganización cromosómica)(Eichenlaub-Ritter, 1996; Tarin et al., 2001).

Entre los factores celulares que contribuyen a la disminución de la calidad del oocito viejo se encuentran cambios en la distribución y número de los gránulos corticales, lo cual se ha relacionado con el aumento de la poliespermia (Diaz and Esponda, 2004). También se ha descrito un aumento de agregados mitocondriales, es decir agrupaciones anormales de mitocondrias en el citoplasma (Tarin et al., 2001). Otras alteraciones importantes son los cambios en la zona pelúcida, la cual es fundamental por ser específica para cada especie y para el control de la poliespermia durante la fecundación (Peluso et al., 1980).

A nivel molecular, los oocitos viejos en ratón presentan un aumento de la actividad del factor promotor de la mitosis (MPF), el cual es un complejo dependiente de ciclinas (Cdc2a/ Ciclina B1) y cuya función es mantener los oocitos en MII (Liu et al., 1998; Tarin et al., 2004). Recientemente, estos resultados han sido cuestionados al observarse una disminución de la actividad del factor MPF y las proteínas kinasas activadas por mitogenos (MAP Kinasas) en oocitos viejos (Tatone et al., 2006). Además, resulta interesante comentar que dicha disminución en la actividad del factor MPF y las proteínas MAP Kinasas en ratón coinciden con lo que ha sido descrito en cerdo (Kikuchi et al., 2002), y en

bovino (Bai et al., 2006).

## **2.5 Aberraciones en oocitos envejecidos *in vitro***

El análisis de la pérdida de capacidad reproductiva en oocitos envejecidos *in vivo* es un procedimiento largo y que supone un elevado coste económico. Por ello, algunos investigadores han estudiado el envejecimiento manteniendo oocitos por largos períodos de tiempo en el interior del oviducto o bien realizando cultivo de oocitos *in vitro*. En relación al envejecimiento de oocitos en el interior del oviducto se ha observado que éstos presentan generalmente alteraciones en el alineamiento y distribución de sus cromosomas (Yu et al., 2007). También se ha propuesto el papel del citoplasma en la producción de dichas alteraciones cromosómicas ya que tras la transferencia nuclear (el oocito es enucleado y su núcleo es reemplazado por un núcleo procedente de una célula del cúmulus oophorus), los embriones producidos llegan en menor porcentaje al estadio de blastocisto (Liu and Keefe, 2007). Además, los oocitos envejecidos *in vitro* muestran un aumento de apoptosis, que está relacionado con menores niveles de BCL2, una proteína relacionada con la regulación de la apoptosis (Gordo et al., 2002; Tatone et al., 2006).

## **2.6 Efecto del envejecimiento durante el estadio de vesícula germinativa**

En general, el efecto del envejecimiento durante el estadio de vesícula germinativa se ha estudiado a nivel citológico. En oocitos humanos, se ha observado que con la vejez el tamaño de sus vacuolas citoplasmáticas aumenta y que la masa mitocondrial disminuye (de Bruin et al., 2004). En ratas, la edad provoca una ondulación de la membrana nuclear de la vesícula germinal, y el nucleoplasma parece más denso (Peluso et al., 1980). Recientemente, se ha intentado revertir el envejecimiento en ratones mediante un trasplante de ooplasma desde vesículas germinativas jóvenes a viejas. Sin embargo, los resultados fueron poco satisfactorios ya que se produjeron errores en el alineamiento

cromosómico en estadios embrionarios posteriores (Cui et al., 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, la información relacionada con ciertas alteraciones en estadio de vesícula germinativa por efecto de la edad es amplia y variada. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los factores moleculares implicados en las alteraciones ocurridas en estadio de VG. A pesar de ello, se puede proponer que determinados factores epigenéticos podrían estar alterados en VG, ya que se ha demostrado un papel central de estos factores durante la maduración del oocito en los últimos años.

### **3. Epigenética y modificaciones de la cromatina**

La epigenética estudia los cambios heredables que no ocurren a nivel de la secuencia del DNA, pero que afectan la función genética (Cheung et al. 2000). Estos cambios pueden generarse bien por modificaciones covalentes del DNA (metilación del DNA) o por modificaciones covalentes de tipo aminoterminal en la cola de las histonas (Cheung et al. 2000). Se han descrito diferentes modificaciones post-traduccionales de histonas y entre las más conocidas se encuentran la metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación. Dichas modificaciones, generadas y controladas por enzimas específicas, regulan el acceso al DNA de las proteínas asociadas a la cromatina, determinando las transiciones dinámicas entre estados transcripcionalmente activos y estados inactivos de la cromatina. Por ejemplo, se sabe que los fenómenos de hipoacetilación y la hipermetilación de histonas están, en general, relacionados con genes reprimidos o silentes (Cheung et al., 2000; Rando, 2007; Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000). Actualmente, se acepta que las modificaciones post-traduccionales de las histonas constituyen un mecanismo de regulación fundamental en todos los procesos nucleares con consecuencias importantes en la determinación del destino final de la célula, tanto normal como patológico (Rando 2007). En el presente estudio, nos hemos propuesto analizar la metilación y la acetilación de histonas en oocitos de hembras viejas puesto que estas modificaciones desempeñan un papel crucial en el empaquetamiento

y en la expresión de genes.

### 3.1 Metilación y acetilación de histonas

Los extremos aminoterminales de las colas de las histonas, particularmente de las histonas H3 y H4, pueden ser metilados por la acción de metilasas específicas en diferentes residuos de lisinas y argininas. Los residuos de lisina susceptibles de ser metilados son las *Lys4*, *Lys9*, *Lys27*, *Lys36* y *Lys79* en la histona H3 y la *Lys20* en la histona H4. Además, los residuos de lisina pueden estar mono-, di- y trimetilados y esta modificación diferencial confiere a la metilación una diversidad funcional (Cheung and Lau, 2005). Así por ejemplo, la dimetilación y trimetilación de la histona H3 en la *Lys4* se asocian, respectivamente, a cromatina competente y cromatina activa desde el punto de vista transcripcional en las regiones eucromáticas en el genoma de mamíferos (Santos-Rosa et al., 2002). Dichas modificaciones no están presentes en los dominios heterocromáticos inactivos desde el punto de vista transcripcional que, en contraste, presentan niveles elevados de histona H3 di- y trimetilada en la *Lys9* (Bannister et al., 2001; Santos-Rosa et al., 2002).

Por otra parte, la acetilación de histonas en diferentes residuos de lisina es un proceso dinámico regulado por dos clases de enzimas: las acetiltransferasas de las histonas (HATs) y las deacetilasas de histonas (HDACs). Numerosos trabajos han mostrado que cambios en la acetilación de las histonas se correlacionan con cambios en la transcripción, replicación y empaquetamiento del DNA, y que la acetilación de histonas juega un papel importante en el control de la función de la cromatina y en la regulación de la expresión génica (Cheung et al., 2000; Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000). Así, en general se considera que las histonas H3 y H4 están hiperacetiladas en genes activos mientras que están hipoacetiladas en genes inactivos (Cheung et al., 2000).

Actualmente, se conocen proteínas cuya presencia se ha correlacionado con las modificaciones de histonas. Entre ellas se encuentra la proteína HP1 $\beta$ , la cual en las células eucariotas se asocia a la cromatina, solamente cuando la histona H3 está metilada en

la lisina 9. Se cree que la metilación de la histona H3 en la *Lys9* genera un sitio de unión para dicha proteína (Eskeland et al., 2007). Otra proteína que se ha correlacionado con las modificaciones de histonas es SIR2. La presencia de ésta proteína se correlaciona con niveles elevados de histona H4 acetilada en la *Lys16* (Chiani et al., 2006).

#### **4. Variaciones de la cromatina y su función en oocitos**

La estructura de la cromatina en estadio de VG varía a lo largo de la oogénesis. Como ya mencionamos anteriormente, las VG reinician la meiosis al llegar a la pubertad. El reinicio de la meiosis ocurre en oocitos que tienen menos de 10µm y que poseen una configuración de cromatina NSN. En consecuencia, durante el proceso de maduración los oocitos requieren de un crecimiento específico así como de cambios estructurales de la cromatina. Los cambios estructurales de la cromatina implican que esta comience a compactarse y forme un anillo de heterocromatina alrededor del nucleolo, esta formación es conocida como cromatina perinucleolar (SN). En oocitos de ratón estos cambios estructurales de la cromatina están asociados con modificaciones en el estado metabólico del genoma del oocito. De tal manera que la configuración NSN exhibe altos niveles de transcripción, mientras que la configuración SN esta asociada con una represión global de la actividad transcripcional in vivo (Bouniol-Baly et al., 1999). Además, la configuración SN está correlacionada con altas tasas de formación de blastocistos después de la fertilización (Zuccotti et al., 1998). Por lo tanto, parece que la regulación de la estructura de la cromatina proporciona al genoma de la VG un nivel adicional de control de la transcripción a escala global.

#### **5. Metilación en oocitos**



En oocitos se ha analizado la presencia de la metilación de las histonas durante la etapa temprana de la meiosis (Sarmiento et al., 2004). Según estos estudios, la metilación de la histona H3 en las lisinas 4 y 9 se han considerado como marcadores epigenéticos estables mientras que la metilación en las argininas 17 y 3 se han considerado marcadores inestables. En general se ha observado que la metilación de tipo estable (en residuos de lisina de la histona H3) está presente en estadio de vesícula germinativa y en estadio de MII, mientras que la metilación de tipo inestable (en residuos de arginina de H3) se encuentra solamente en el estadio de VG (Sarmiento et al., 2004).

## **6. Acetilación de histonas en oocitos**

Se ha demostrado que en los oocitos en estadio de VG se encuentran acetiladas las lisinas 9 y 14 de la histona H3 (H3K9ac, H3K14ac) y en la lisina 5, 8, 12 y 16 de H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac y H4K16ac) (Kim et al., 2003). El grado de acetilación presente en dichos residuos de lisina disminuye hasta ser indetectable en el estadio de MII. Este mecanismo parece estar controlado por deacetilasas (HDACs) debido a que el tratamiento de los oocitos con el inhibidor de HDACs, Tricostatina A (TSA), induce la presencia de acetilación en el estadio de Metafase II (Kim et al., 2003).

Por otra parte, las HDACs tienen gran importancia en la maduración meiótica debido a que su inhibición produce desorganización de la cromatina en el núcleo y en la región perinuclear; y como consecuencia anomalías en los cromosomas y en la formación del huso (De La Fuente, 2006). Estudios *in vitro* han revelado que la acetilación de la histona H4 en la lisina 12 (H4K12ac) varía de forma muy dinámica durante la maduración meiótica del oocito (Akiyama et al., 2004). Oocitos madurados *in vitro* presentan patrones de acetilación de H4K12 en estadio de VG, pero a partir de pocas horas en cultivo (3 h) no se detecta H4K12ac, con excepción de un corto período de acetilación a las 9 horas. Estos cambios temporales de los niveles de H4K12ac en oocitos se han relacionado también con

la actividad y la síntesis del Factor Promotor de Maduración Meiótica (MPF) ya que la inhibición de este factor induce hiperacetilación de H4K12 de oocitos en MII (Akiyama et al., 2004). Sin embargo, esta correlación se ha cuestionado debido a que no se han obtenido los mismos resultados en experimentos similares con oocitos de porcino (Endo et al., 2005). El MPF es un factor de regulación formado por dos proteínas kinasas, la ciclina B y el Cdc2a. Se ha propuesto que la actividad kinasa de Cdc2a y la síntesis de esta proteína son responsables de la activación de las deacetilasas (HDACs), debido a que su inhibición causa acetilación de H4K12ac (Akiyama et al., 2004).

Por otra parte, los oocitos en MII de hembras viejas presentan niveles detectables de acetilación de la histona H4 (H4K12ac, H4K16ac, H4K5ac y H4K8ac), a diferencia de hembras jóvenes donde no se observan acetilación de la histona H4 (Akiyama et al., 2006). Estas variaciones en los niveles de acetilación de H4 han sido confirmados mediante experimentos en los que se ha inhibido la actividad HDACs durante el proceso de maduración meiótica y se ha observado la producción de oocitos en MII con poliploidías y aneuploidías similares a las presentes en oocitos viejos (Akiyama et al., 2006).

Basándonos en la importancia que tienen las modificaciones covalentes de las histonas durante el desarrollo del oocito, proponemos que algunas alteraciones producidas por el envejecimiento podrían estar relacionadas con modificaciones en el grado de acetilación/metilación de histonas. En este contexto, nos hemos propuesto analizar en ratón los patrones de acetilación/metilación de histonas presentes en el estadio de VG y su posible relación con el gen *Cdc2a*.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

El objetivo general de esta Tesis es analizar algunas de las alteraciones causadas por el envejecimiento en el oocito de mamíferos, tomando como modelo el ratón. Se estudian con principal interés los cambios ocurridos en el núcleo del oocito, especialmente aquellos que afectan a la cromatina.

### Objetivos Específicos

1) Determinar las modificaciones epigenéticas ocasionadas por la vejez. Se analizará especialmente la presencia de las modificaciones post-transcripcionales de histonas tales como la metilación y la acetilación. En concreto se analizarán la metilación de la histona H3 en la lisina 9, 36, 79; la histona H4 en la lisina 20; y en la acetilación de la histona H4 en la lisina 5, 8, 12 y 16 utilizando anticuerpos específicos.

2) Analizar en oocitos la presencia de algunas proteínas relacionadas con las modificaciones de histonas. Entre estas proteínas se eligieron la SIR2 relacionada con la acetilación de la histona H4 en la lisina 16; la HP1 $\beta$  proteína relacionada con metilación de histona H3 en la lisina 9.

3) Determinar en oocitos la expresión del gen *Cdc2a* relacionado con la acetilación de la histona H4 en la lisina 12. Además, analizar cualitativamente la presencia de la proteína Cdc2a y su actividad enzimática en el oocito.

4) Determinar el efecto de la maduración *in vitro* sobre la acetilación de la histona H4 en la Lys12 en oocitos viejos.

5) Analizar el grado de apoptosis inducido por la vejez en las células del cumulus oophorus. Debido a que las células del cumulus tienen una función importante en la fisiología del oocito durante el proceso de maduración, se analizarán sus características apoptóticas.

6) Para estudiar el mecanismo de regulación de la acetilación se propone observar el efecto de la ausencia de acetilasas (enzimas que controlan la acetilación de histonas) sobre la acetilación de la histona H4 en la *Lys12* y la proteína Cdc2a en oocitos de hembras viejas.

7) Empleando la inhibición de las deacetilasas se pretenderá revertir el efecto que tiene la vejez sobre la acetilación de la Histona H4 en la Lisina12 y sobre la presencia de la proteína Cdc2a

## MÉTODOS

### 1. Animales

Los animales empleados en este estudio fueron hembras de ratones (*Mus musculus*) de la cepa CD-1. Se consideraron adultas jóvenes, a las hembras que tenían entre 2 y 3 meses, y viejas, a las que tenían entre los 12 a los 19 meses.

Los animales fueron mantenidos en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas en condiciones de agua y comida ad libitum, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, y temperatura y humedad constantes. En todos los casos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Todos los métodos empleados estuvieron de acuerdo con el European Union Agreement on Vertebrate Animal protection (3/8/2005) y con lo dispuesto por el Comité de Ética del CSIC (España).

### 2. Extracción de oocitos

Para la obtención de oocitos en Metafase II, las hembras se superovularon mediante dos inyecciones intraperitoneales, la primera de 5UI de la hormona gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG, Sigma) y la segunda de 5 UI de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) 48 horas más tarde. En estas condiciones, la ovulación ocurre aproximadamente 12 horas después de la inyección de hCG. Los oocitos de hembras viejas y jóvenes fueron extraídos 10 horas post ovulación. Para ello se sacrificó el animal y se realizó una incisión en la línea media abdominal, exponiéndose y extrayéndose el oviducto en medio M2 (Sigma). Bajo un microscopio estereoscópico se realizó un corte fino mediante una tijera de iris en el ámpula oviductal. De esta forma los oocitos ovulados son expulsados al medio en que se encontraba el oviducto.

Para la obtención de oocitos en estadio de vesícula germinativa, el ovario se extrajo

bajo un microscopio estereoscópico con iluminación lateral. Para extraer los oocitos, los folículos fueron puncionados con una aguja de 27G en medio M2 (Sigma). De tal forma se liberan los gametos, que aparecen como oocitos libres y rodeados por las células del cumulus. Las células del cumulus fueron removidas lentamente por pipeteo a través de una pipeta fina empleando medio M2 adicionado con 0.2mM 3 isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) para evitar la activación del oocito. Posteriormente, los gametos fueron procesados para las diferentes técnicas que se describen a continuación.

### 3. Inmunocitoquímica

Los oocitos en estadio de vesícula germinativa fueron fijados en paraformaldeído al 4% en solución fosfato (PBS, pH 7.4) durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS y a continuación fueron permeabilizados incubándolos en una solución de Tritón X-100 por 15 min. Se realizó posteriormente el tratamiento con una solución de bloqueo, PBS-BSA (1%), por 2h. y después se procedió a la incubación con el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios se usaron a una dilución de 1:100 en PBS y la incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos primarios que se emplearon reconocen: acetilación de la histona H4 en la Lys16 (H4K16ac), Lys12 (H4K12ac), Lys8 (H4K8ac) y Lys5 (H4K5ac); dimetilación de la histona H3 en la Lys9 (H3K9me2); y en Lys4 (H3K4me2); trimetilación de la histona H3 en la Lys9 (H3K9me3) y dimetilación de H4 en la Lys20 (H4K20me2); todos ellos comerciales (Abcam). Anticuerpo para detectar la proteína Cdc2a (Santa Cruz Biotechnology) y la RNAPolIII fosforilada (Abcam). Tras la incubación con el anticuerpo primario, las muestras se lavaron 5 veces con PBS-Tween y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos secundarios usados fueron: IgG anti-conejo conjugado con FITC (Sigma) en el caso de los primarios para las modificaciones de las histonas utilizadas y IgG anti-ratón conjugado con FITC para detectar Cdc2a, y RNAPolIII. En ambos casos la dilución empleada fue 1:100 en PBS conteniendo BSA 1mg/ml y la incubación se realizó por 1h a 37°C. Después, se procedió a lavar abundantemente las

muestras con PBS y finalmente estas se tiñeron durante 1 minuto con el fluorocromo DAPI (300µg/ml en PBS) para visualizar el ADN. A continuación las muestras fueron montadas empleando el medio de montaje Mowiol (Calbiochem. USA) y fueron observadas mediante un microscopio de fluorescencia confocal LEICA TCS-SP2-AOBS. Cuando se considero necesario, se realizaron secciones seriadas de un espesor de 0.1-0.25µm.

Para cada uno de los anticuerpos utilizados se analizaron entre 30-60 oocitos, tanto para hembras jóvenes como viejas. Una vez realizadas las preparaciones inmunocitoquímicas se efectuaron entre 5-10 secciones ópticas para cada uno de los oocitos empleados. Dichas secciones se realizaron mediante el programa computacional del Microscopio Confocal.

#### **4. Análisis de la intensidad de los niveles de fluorescencia**

El análisis semi-cuantitativo de la intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas por el láser del microscopio confocal fueron realizadas usando el programa “ImageJ” (dominio público, <http://rsb.info.nih.gov/ij/features.html>). El valor de los pixeles entre unidad de área fue medido en cada uno de los núcleos y el promedio del valor de dos regiones diferentes del citoplasma fue sustraído como fondo. Este valor fue multiplicado por el grosor del núcleo para corregir diferencias aparentes. El grosor del núcleo fue medido con el microscopio confocal. En cada experimento, para normalizar los datos, el valor promedio calculado por el núcleo de la VG joven fue considerado como el valor de 1 y los valores de las VG viejas fueron expresados por su valor relativo. El nivel de fluorescencia fue obtenido de la medición de al menos 30 oocitos por experimento.

#### **5. RT-PCR**

Los oocitos extraídos de hembras jóvenes y viejas fueron colectados y colocados a -20°C por lo menos durante 2 horas. Para la extracción de ARN se utilizo el método ya

descrito (Daniels et al., 1997). Se empleó un tampón de lisis (8µl Igepal (10%) (Sigma), 5µl DTT (0.1mM), 1.5µl RNAsin (Promega), 85.5µl H<sub>2</sub>O). Se utilizaron 0.2µl de tampón lisis por oocito tratado. A continuación, se centrifugó brevemente a 12000 g., y se calentó a 75°C durante 5 minutos. Las muestras fueron transferidas a hielo para bajar rápidamente la temperatura.

Para la transcripción reversa (RT) se empleo el kit “SuperScrip II reverse transcriptasa” (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se emplearon diluciones finales de 20µl conteniendo el RNA correspondientes a 2 oocitos. El tampón utilizado fue “First Strand Tampón 1X” (Invitrogen) conteniendo 0.01mM DTT (InvitroGen), 0.5mM dNTP (Promega), 40U RNAsin (Promega), 10U ADNase I (ROCHE), 200U SuperscripII, 0.5U OligodeT (Sigma) 1µl.

Del resultado de la transcripción reversa, una cantidad de cADN que aproximadamente correspondía a dos oocitos, se empleó como molde para la reacción de PCR. Se utilizó la enzima Go Taq polimerase (Promega) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Brevemente, una solución final de 20µl fue preparada conteniendo tampón 1X de Go taq, cADN (correspondiente a 2 oocitos), 300 µM DNTPs, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 U/µl Go Taq DNA Polimerasa y 0.3 µM de cada cebador. Los cebadores utilizados fueron: *Cdc2a* GGACTACAAGAACACCTTTC y ACGGAAGAGAGCCAACGGTA (262pb), *β-actina* TCCGTGATCAAAGAGAAG y CGGATGTCAACGTCACACTT (300pb). Las condiciones usadas en la PCR fueron las siguientes para *Cdc2a* y *β-actina* respectivamente: 2 y 1 minutos de desnaturalización inicial a 94 y 96°C ; luego 35 ciclos cada uno de ellos compuesto de: 45 y 15 segundos a 94 y 95°C para la desnaturalización, 60 y 15 segundos de anillamiento a 55 y 60°C y 60 y 15 segundos a 72°C para elongación, tras los cuales hubo un paso final de 5 minutos a 72°C. Después de la amplificación por PCR, los productos de la RT-PCR se mezclaron con tampón de carga, se cargaron en un gel de agarosa al 3% y se tiñeron con 5µl de bromuro de etidio (10ng/ml). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se observaron y fotografiaron en un transiluminador bajo luz ultravioleta. En el caso de las RT-PCR se utilizó un análisis densitométrico que fue llevado a cabo usando el software “Quantity One 1-D” (Biorad USA, Life Science Research



Hercules, C.A.). Cada experimento de RT-PCR se repitió tres veces.

## **6. Maduración *in vitro* de VG**

Para obtener oocitos en crecimiento se procedió a realizar la maduración *in vitro* como se ha descrito antes (Akiyama et al., 2004). Brevemente, las hembras de 6 semanas (jóvenes) y de 13 meses (viejas), se superovularon mediante una inyección intraperitoneal con 5 UI de la hormona gonadotrofina de suero de yegua preñada (PMSG, Sigma). Los ovarios fueron removidos del ratón 47 horas post-PMSG y transferidos a medio M2 precalentado a 37°C suplementado con 3 mg/ml de Albumina de suero de bobino (BSA, embryo tested, Sigma.). Los ovarios fueron pinchados con agujas de 27-G para liberar las VG de su interior. Las VG obtenidas presentaban dos características: a) algunas mostraban células del cúmulo alrededor de la VG (VG con CC), b) no presentaban células del cúmulo (sin CC). Además, c) se obtuvieron VG sin células del cúmulo (De CC) pasando varias veces las VG (con células del cúmulo) a través de una pipeta delgada. Los tres tipos de VG: a) con CC, b) sin CC y c) De CC fueron transferidos en medio fresco M2 e incubados en cámara húmeda de 5%CO<sub>2</sub>/95% aire y 38°C. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

## **7. Tratamiento con TSA**

A fin de inhibir la actividad de las deacetilasas de histonas en la VG se empleó el inhibidor tricostatina A (TSA) como en el trabajo realizado por Akiyama y col 2006. Brevemente, se agregaron 100nM de TSA (Sigma) al medio de cultivo por 1 h o por 18h. Una solución stock de TSA (1mM en M2) fue diluida con medio de cultivo M2 (Sigma) inmediatamente antes de ser usada. Como control se realizaron cultivos de VG en ausencia de TSA. El tratamiento con TSA fue realizado por triplicado.

## **8. Medición de la actividad kinasa**

La medición de la actividad kinasa de la proteína Cdc2a se realizó de acuerdo con el método previamente descrito (Ito et al., 2005). Se emplearon oocitos extraídos en estadio de VG o MII, los cuales fueron lavados con PBS varias veces y fueron colocados en tampón de lisis 1X (Cell Signaling) (5µl/10 oocitos). Dicho tampón contenía los inhibidores pepstatina 1µg/ml (Sigma) y aprotinina (1µ/ml)(Sigma). Seguidamente, los tubos fueron congelados a -80°C hasta la realización del ensayo de actividad kinasa.

Se utilizó el kit MESACUP para detectar la actividad kinasa de Cdc2a (MESACUP Cdc2a kinase assay kit, MBL). Este kit está basado en un test de ELISA que utiliza como sustrato a un péptido sintético (MV Biotinilatado) para medir la actividad kinasa de Cdc2a. De tal forma que al actuar Cdc2a en este péptido, lo fosforila y éste emite una señal que es reconocida por un anticuerpo monoclonal específico. Las muestras con los oocitos fueron procesadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se agregó a los tubos (conteniendo 5µl de tampón lisis+oocitos) 5µl del tampón de reacción del Kit 10X, 5µl del péptido biotinilatado MV, 30µl de H<sub>2</sub>O destilada, y 5µl de ATP (1mM). Se mezcló el contenido del tubo y se colocó en baño María durante 10 minutos a 30°C. Se bloqueó la reacción empleando 200µl de reactivo de parada de la fosforilación. Después de mezclar se centrifugó 15 segundos a 14000 r.p.m. Se extrajo 100µl de cada tubo y se colocaron en las placas del Kit que contenían el anticuerpo monoclonal anti-fosfoMV. Se incubaron a 25°C por 60 minutos, para la unión del péptido MV con el anticuerpo. A fin de detectar el péptido se adicionó 100µl de streptavidina conjugada a peroxidasa por 30 min a 25°C. Y a continuación se adicionó 100µl el sustrato de la peroxidasa y se incubó 25°C por 5 minutos. Se detuvo la reacción con la solución de parada (20% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y la medición de color fue realizada con un espectrofotómetro a 492nm. Los experimentos de medición de actividad kinasa se realizaron por triplicada utilizando se utilizó 10 oocitos en cada experimento.

## **9. Detección de apoptosis en los oocitos mediante la técnica de TUNEL**

Para llevar a cabo esta técnica, las VG de hembras jóvenes (3 meses) y viejas (13

meses) una vez extraídas del ovario con células del cúmulo se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS, pH 7,4, una hora a 15-25°C. Este experimento se realizó por triplicado utilizando al menos entre 15 y 20 oocitos cada vez. Posteriormente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron en una solución de 0.1% Tritón X-100 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron dos veces en PBS y se adicionó a las muestras 50µl de la reacción de TUNEL ( 45µl de TUNEL Label + 5µl TUNEL Enzyme, ROCHE). Como control negativo, se utilizó el sustrato de la enzima ( 50µl TUNEL Label, ROCHE). Como control positivo se adicionó DNAsaII (Sigma) (10µg/ml) en medio M2 durante 1h antes de la fijación. Las reacciones se incubaron en cámara húmeda y oscuridad durante 1 hora a 37°C. Seguidamente, las VG con células del cúmulo (con CC) se lavaron 3 veces en PBS, se tiñeron con Dapi (300µg/ml) y se montaron con Mowiol (Calbiochem. USA). Finalmente, los oocitos con CC fueron observadas mediante un microscopio de fluorescencia confocal LEICA TCS-SP2-AOBS realizándose secciones seriadas de un espesor de 0.1-0.25µm.

## **10. Microscopía electrónica (ME)**

### **10.1. Procesamiento y fijación de las muestras**

Para su observación en ME, los oocitos de diferentes edades fueron fijados en una solución fijadora (cacodilato 0.1M, sucrosa 0.2M, glutaraldehído 2%, paraformaldehído 1%) durante 2 horas. A continuación, las muestras fueron lavadas en solución de lavado (cacodilato 0.1M, sucrosa 0.2, sin fijadores) varias veces durante el día, para seguir con la postfijación en tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 2% por 2 horas. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con una serie de alcoholes de 30°, 50°, 70°, y 100° (cada tratamiento fue de 2-4 horas). Cumplido el tiempo, se retiró el alcohol y se añadió óxido de propileno. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos, evitando que las muestras se secarán. A continuación, se añadió una mezcla de Epon:óxido de propileno 1:3. Después se pasó a una mezcla de Epón:óxido de propileno 1:1, durante otra hora y finalmente a Epón: óxido de propileno

3:1, donde se dejaron las muestras también durante 12 horas. Las muestras se colocaron en Epón sólo y luego se realizó la inclusión en cápsulas de gelatina o en molde de plástico. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en una estufa a 60°C y se dejaron allí durante 48 horas para que polimerizara el Epón.

### **10.2. Técnica del PTA alcohólico (Sheridan WF & Barnet RJ, 1969)**

Este método se empleó para revelar la presencia de histonas ricas en lisina y en general para proteínas básicas. Para ello, se llevó a cabo un procedimiento muy similar al anterior, con la única diferencia que no se realizó una segunda fijación con OsO<sub>4</sub>. Las muestras una vez fijadas con la solución fijadora (cacodilato 0.1M, sucrosa 0.2M, glutaraldehído 2%, p-formaldehído 1%), se lavaron en la solución lavadora varias veces y se deshidrataron en alcoholes de 30°, 50°, 70° y 100°. Una vez que se hicieron los 2 lavados en alcohol de 100°, se preparó PTA (ácido fosfotúngstico 1% en alcohol de 100°). Las muestras se colocaron en esta solución toda la noche en hielo a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 a 4 veces en alcohol de 100° y se siguió el mismo procedimiento de inclusión en Epón, anteriormente mencionado.

### **10.3. Cortes ultrafinos**

Para el análisis de las muestras en ME, se realizaron cortes semifinos de 1 a 2 µm de grosor y otros ultrafinos de 500 a 800 Å, utilizando un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos fueron observados en un microscopio de contraste de fase, para identificar los oocitos y seleccionar el área de tallado, para realizar los cortes ultrafinos de alrededor de 500 Å. Estos últimos se recogieron en una rejilla de cobre por contacto. La tinción se realizó con acetato de uranilo al 0.1 % en agua y luego con citrato de plomo según el método de Reynolds (1963). Esta tinción fue empleada para todo el material post-fijado con OsO<sub>4</sub>. Para las muestras en que se empleó la técnica del PTA alcohólico, los cortes se observaron sin coloración adicional. Para todas las observaciones se utilizó un Microscopio

Electrónico Philips 300.

### **11. Análisis estadístico**

Por lo menos tres experimentos independientes fueron realizados en cada estudio. Los resultados obtenidos correspondientes al porcentaje de oocitos en los diferentes estudios se realizó como se ha descrito previamente (Akiyama et al., 2006), a través de un análisis del Test de Chi-cuadrado Programa SPSS 13.13.0. Y los resultados correspondiente a los niveles de fluorescencia de las vesículas germinativas fueron analizados de acuerdo al trabajo realizado por Kageyama y col (2007) a través del Test de T-Student del programa SPSS 13.0. El análisis estadístico de la actividad kinasa de Cdc2a fue realizado con el Test de T-Student (Ito et al., 2005).

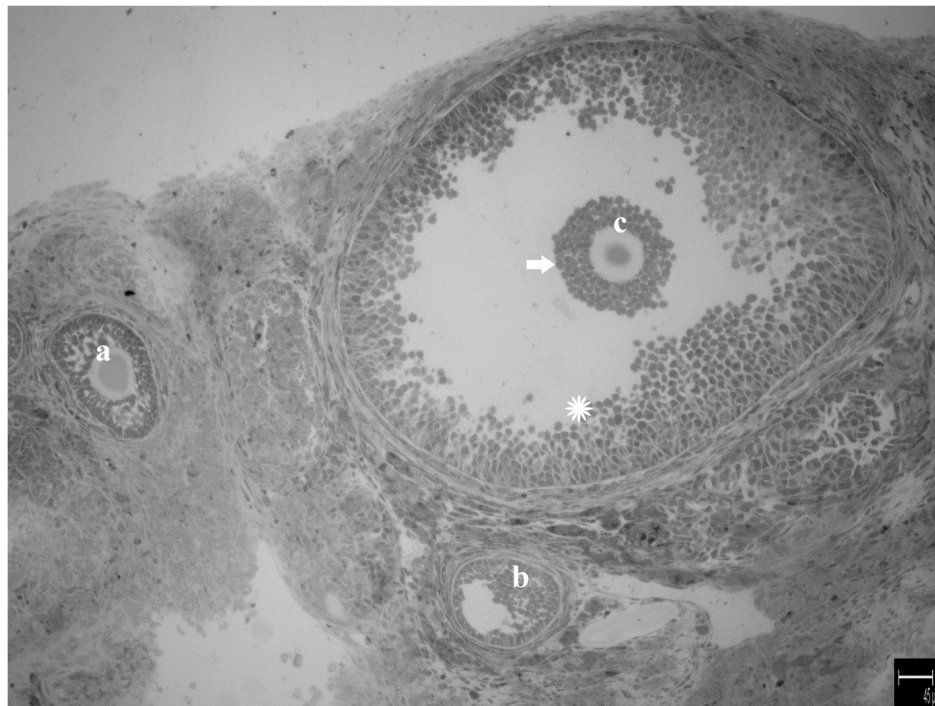
### **12. Reactivos**

Todos los productos utilizados fueron de Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., España), Promega (Promega, USA), Roche (Roche, USA), Invitrogen (Invitrogen, USA), Biorad (Biorad, USA), Upstate (Upstate-USA).

## RESULTADOS

### 1. Distribución de la cromatina en oocitos de hembras jóvenes y viejas en estadio de vesícula germinativa (VG)

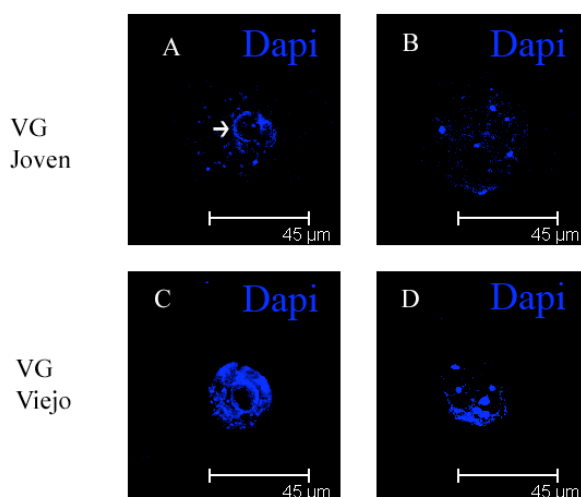
En los cortes de ovario observados en el microscopio de contraste de fase, se pueden apreciar oocitos en diferentes estadios de crecimiento de acuerdo al número y disposición de las células que los envuelven (Figura 1). Los folículos secundarios, terciarios y antrales se caracterizan por contener oocitos rodeados de células de la granulosa (Figura 1). En el folículo maduro o de De Graaf se observa un espacio claro (realmente ocupado por un líquido) que se denomina antro folicular. Asimismo, en el centro del folículo se observa al oocito rodeado de células del cúmulus oophorus. Éste oocito se encuentra en estadio de VG y aparece como una estructura redondeada de 70 $\mu$ m (Figura 1).



**Figura 1:** Corte semifino del ovario de ratón de una hembra joven observado por contraste de fase. Se observan oocitos en tres estadios de desarrollo: folículos en crecimiento: a y b, folículo de Graff: c. Células de cúmulos oophorus (flecha blanca) y células del cúmulos de la granulosa externa (asterisco blanco).

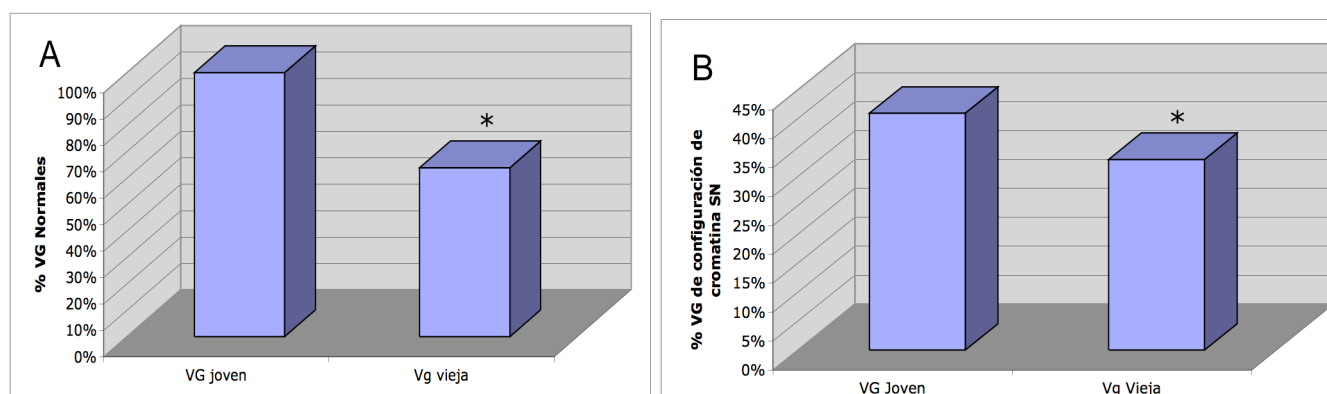
El citoplasma del oocito en estos estadios de VG aparece con una escasa densidad. El núcleo es de forma esférica, posee un diámetro de aproximadamente 45 $\mu$ m y aparece generalmente como un núcleo claro en el cual ocasionalmente se observa un nucleolo esférico y denso.

Los análisis realizados empleando la técnica de fluorescencia y microscopía electrónica muestran los dos tipos de organización de la cromatina características de VG: núcleos con cromatina alrededor del nucleolo (SN) y núcleos sin cromatina alrededor del nucleolo (NSN) (Figura 2 A,B). Nuestros resultados muestran que todas las VG jóvenes pudieron ser clasificadas en estos dos grupos; sin embargo algunas VG viejas no pudieron ser incluidas en estos dos grupos y por tanto las consideramos como VG anormales. Los oocitos con cromatina anormal muestran cromatina muy compacta (Figura 2C), cromatina muy laxa y cromatina condensada en una región del núcleo (Figura 2D).



**Figura 2:** Distribución de la cromatina en VG joven y vieja. Oocitos jóvenes y viejos fueron teñidos con Dapi y analizados por microscopía de fluorescencia. Se observan los dos tipos de distribución de la cromatina en oocitos jóvenes SN (A) y NSN (B). La flecha en A muestra la cromatina alrededor del nucleolo. Los oocitos viejos muestran, además, patrones anormales de cromatina, que se pueden observar en C (cromatina muy compacta) y D (cromatina condensada en una región del núcleo).

Al cuantificar nuestros resultados, observamos que las hembras jóvenes presentaban un 100% de VG con cromatina de apariencia normal, observándose los dos tipos de distribución: SN en un 41% de los gametos, y NSN en un 59%. Por otro lado, las VG de hembras viejas presentaron una disminución significativa de los porcentajes de cromatina normal ( $p < 0,05$ ; Test Chi-Cuadrado), mostrando solo un 75% de oocitos con cromatina normal, presentando éstas la distribución SN en un 33% y NSN en un 67% (Figura 3A). Además, en las VG de hembras viejas se observó un 25% de VG con cromatina anormal. Dentro de este grupo se observaron las siguientes variaciones: 1) 32% cromatina muy compacta; 2) 36% cromatina muy laxa; y 3) 32% cromatina condensada en una zona de la periferia nuclear.



**Figura 3:** Distribución de la cromatina en oocitos jóvenes y viejos en estadio de VG. (A) Los oocitos de hembras viejas muestran una disminución significativa del porcentaje de oocitos con cromatina normal ( $p < 0,01$ ; Test Chi-Cuadrado). (B) Los oocitos normales de hembras jóvenes y viejas se clasificaron de acuerdo a la organización de cromatina en SN y NSN. Los oocitos de hembras viejas muestran una disminución significativa de oocitos con la organización de cromatina SN ( $p < 0,05$ ; Test Chi-Cuadrado).

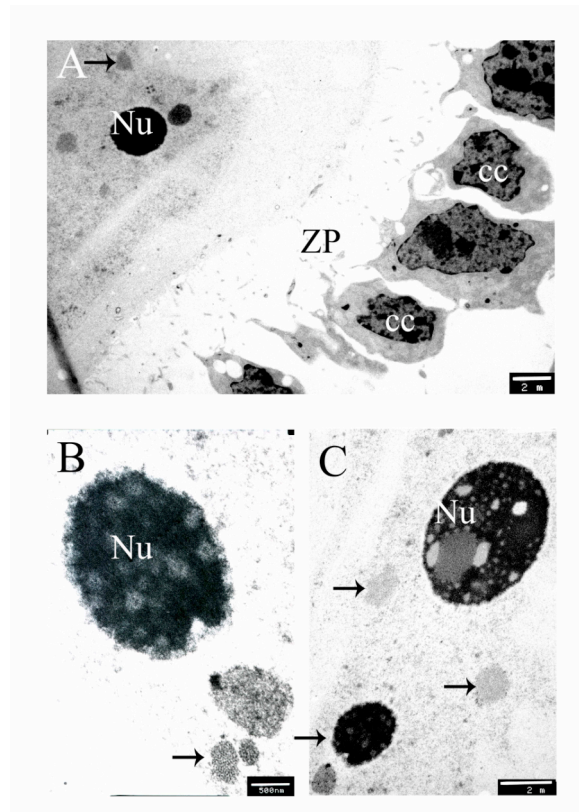
2.



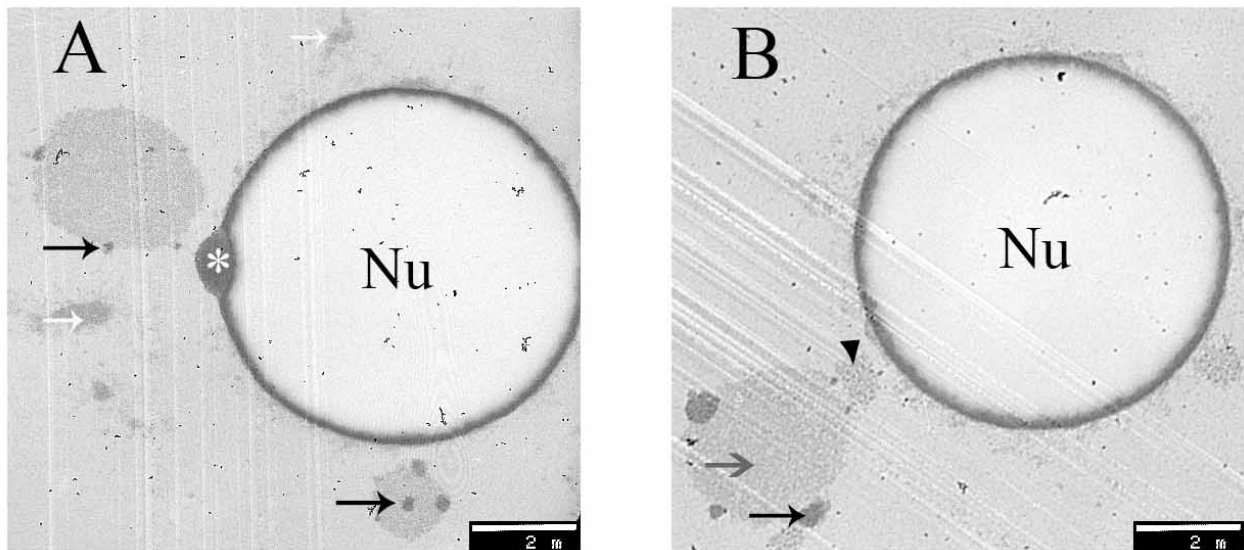
### **3. Análisis ultraestructural de la cromatina de oocitos jóvenes y viejos en estadio de VG**

El análisis mediante microscopía electrónica también revela las características observadas mediante microscopía de fluorescencia. En el caso de las VG se ha observado en hembras jóvenes la presencia de un núcleo considerablemente claro a los electrones en el que se destacan por su densidad uno, o a veces, dos nucleolos. Los nucleolos son generalmente redondeados y en ocasiones muestran algunas vacuolas en su interior (Figura 4 ). La estructura nucleolar en estos casos es fundamentalmente fibrilar con algunos gránulos periféricos. La cromatina aparece uniformemente repartida como filamentos muy finos y laxos por todo el núcleo, a excepción de algunas pequeñas masas de cromatina densa que ocasionalmente aparecen cerca de las masas nucleolares (Figura 4 A, B y C).

En hembras viejas se ha observado la estructura de cromatina característica (SN) mostrada en la Figura 2 A mediante la microscopía de fluorescencia. En estos núcleos el nucleolo también es claro y se caracteriza por ser un gran nucleolo esférico. En los preparados teñidos mediante PTA alcohólico estos nucleolos están teñidos sólo en la periferia, lo que se debe a un efecto de entrada del colorante dentro de esta estructura extraordinariamente compacta. Este es un nucleolo fundamentalmente fibrilar y sin vacuolas, que aparece totalmente rodeado por una fina masa de cromatina relativamente laxa. Estos nucleolos aparecen relacionados con una masa de cromatina muy densa y generalmente están cercanos a masas de cromatina de menor densidad, en las que es frecuente observar pequeñas regiones densas (Figura 5 ). Se puede sugerir que las figuras de la cromatina en hembras jóvenes (Figura 4) corresponden al tipo NSN, y en hembras viejas (Figura 5) corresponden al tipo de organización de cromatina SN.



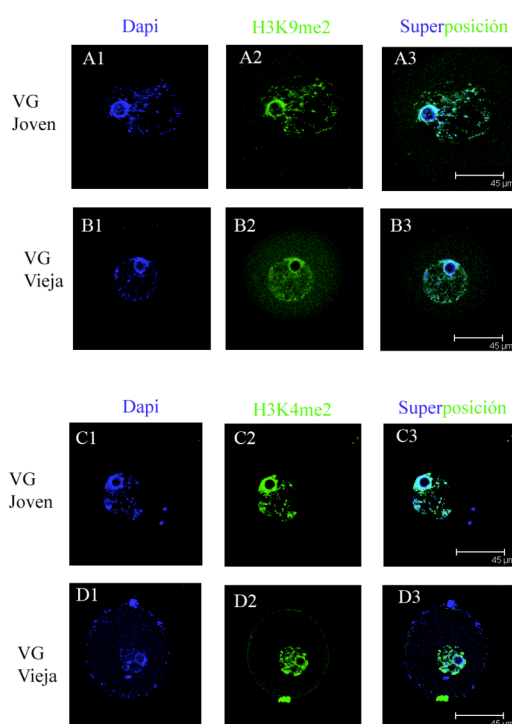
**Figura 4:** Fig A-C.- Células del cúmulo y oocitos de hembras jóvenes observados después de la tinción con PTA-Alcohólico. A) Se observa una región del oocito rodeado por varias células del cumulus (cc). En el núcleo aparece un nucleolo muy denso de apariencia muy fibrilar (Nu) rodeado de varias masas pequeñas de cromatina densa (flechas). El resto del núcleo es claro a los electrones (2500X). B) Un detalle de un nucleolo (Nu) similar al de la Fig.A. Se observan además las masas de cromatina densa cercanas al nucleolo (flechas). El resto del núcleo está ocupado por filamentos de cromatina muy claros y laxos (8000X). C) Una imagen similar a la anterior pero en la que se observan dos nucleolos (Nu), uno de ellos muestra pequeñas vacuolas. Las masas de cromatina densa están indicadas con flechas. El núcleo aparece ocupado por cromatina muy laxa. 4000X.



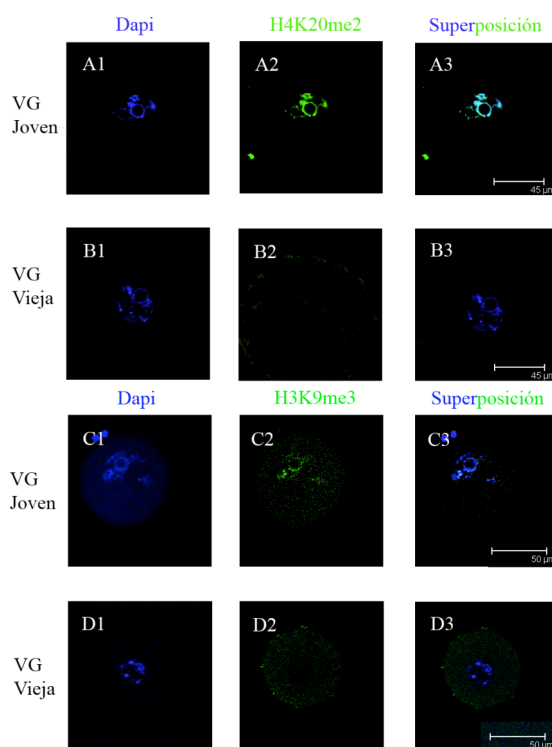
**Figura 5:** Núcleo de un oocito de una hembra vieja teñido con la técnica del PTA alcohólico. A) Se observa el interior de un núcleo en el que se destaca un gran nucleolo redondeado (Nu). El nucleolo es muy compacto y mediante esta técnica de coloración sólo aparece contrastada su periferia. En el núcleo la cromatina es uniformemente laxa. Asociada al nucleolo aparece una masa densa de cromatina (\*) probablemente correspondiente a una región heterocromática adyacente al organizador nucleolar. Cerca del nucleolo se observan otras regiones de cromatina densa en forma de pequeñas esferas (flechas negras). Esparcidas por el nucleoplasma aparecen regiones cromáticas de cierta densidad (flechas blancas). 4000X. B) Un detalle de una figura similar a la anterior. Se observa el nucleolo y la cromatina que le rodea como filamentos muy finos. Cercana al nucleolo se aprecia una masa de cromatina que contiene tres regiones diferentes: Una zona de mediana densidad (flecha gris), zonas muy densas (flecha negra), estructuras que muestran pequeñas áreas de alta y baja densidad (triángulo negro). 4000X:

#### 4. Metilación de H3K9me2, H3K9me3, H4K20me2, H3K36me2 y H3k79me en oocitos (VG) de hembras jóvenes y viejas

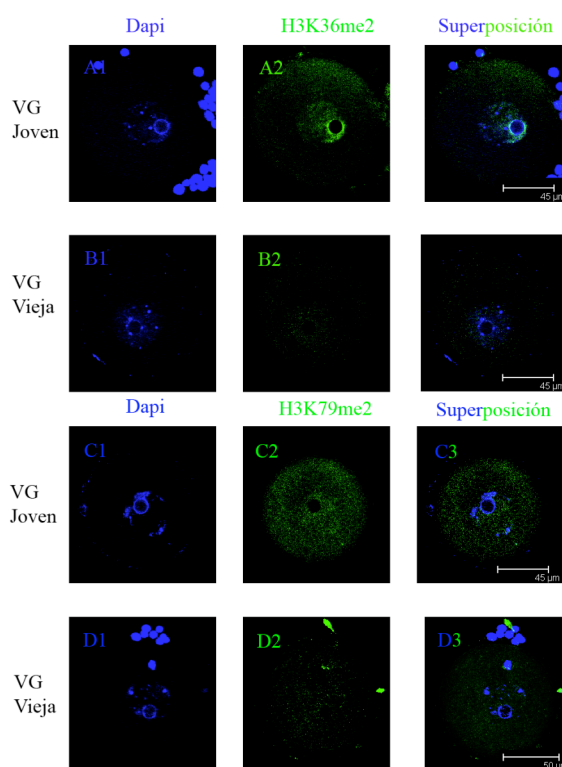
En oocitos de hembras jóvenes y viejas se examinó comparativamente la metilación de las histonas H3/H4 en diferentes residuos de lisina. Los resultados del análisis inmunocitoquímico muestran que en VG jóvenes y viejas no se detectan diferencias de marcaje con los anticuerpos que reconocen H3K9me2 y H3K4me2 (Figura 6). Por otra parte, el marcaje con los anticuerpos que reconoce H3K9me3, H4K20me2, H3K36me2 y H3k79me resultó diferente entre VG jóvenes y viejas (Figura 7, Figura 8,). Los oocitos jóvenes presentaron un 100% de marcaje positivo para H3K9me3, H4K20me2, H3K36me2, H3k79me, mientras que en el caso de los oocitos de hembras viejas se detectó marcaje positivo en sólo un 67%, 81%, 75% y 50% respectivamente. (Figura 9, Tabla 1).



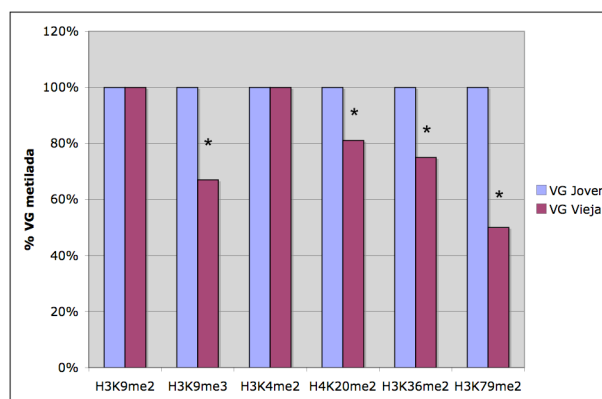
**Figura 6:** Marcaje de la metilación H4K9me2 y H3K4me2 en oocitos de hembras jóvenes y viejas. (A1-D1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-H4K9me2, (C2,D2) anticuerpo anti-H3K4me2, (A3-D3) superposición de imágenes. Se detecta la presencia de señales de metilación H4K9me2 y H3K4me2 tanto en oocitos de hembras jóvenes (A2, C2) como en oocitos de hembras viejas (B2,D2), respectivamente.



**Figura 7:** Marcaje de la metilación H4K20me2 y H3K9me3 en oocitos de hembras jóvenes y viejas. (A1-D1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-H4K20me2, (C2,D2) anticuerpo anti-H3K9me3, (A3-D3) superposición de imágenes. Se observa la presencia de la metilación H4K20me2 y H3K9me3 con un patrón definido en los oocitos de hembras jóvenes (A2, C2), mientras en los de hembras viejas no se aprecia marcaje (B2, D2).



**Figura 8:** Marcaje de la metilación H4K36me2 y H3K79me2 en oocitos de hembras jóvenes y viejas. (A1-D1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-H4K36me2, (C2,D2) anticuerpo anti-H3K79me2, (A3-D3) superposición de imágenes. Se observa la presencia de la metilación H4K36me2 y H3K79me2 con un patrón definido en los oocitos de hembras jóvenes (A2, C2), mientras en los de hembras viejas no se aprecia marcaje (B2, D2).



**Figura 9:** Cuantificación del porcentaje de VG marcadas para la metilación de histonas H3/H4 en distintos residuos de lisina en VG jóvenes y viejas. En VG de hembras viejas respecto a las jóvenes, se observa una disminución significativa de la metilación de histonas H4K20me2, H3K36me2 y H3K79me2 en un 33%, 19%, 25%, 50 %, respectivamente.

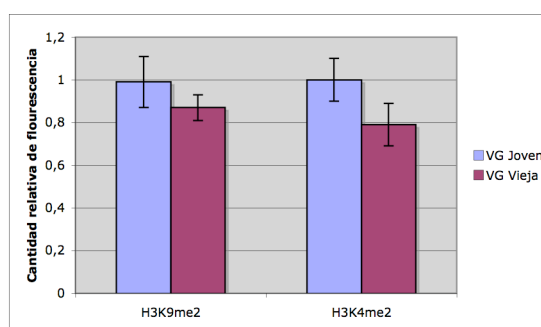
respectivamente ( $p < 0,05$ ; Test Chi-Cuadrado). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

GV	Metilation	Total de oocitos	Numero de oocitos metilados (%)
Joven	H3K9me2	54	54 (100)
Vieja	H3K9me2	60	60(100)
Joven	H3K9me3	33	33 (100)
Vieja	H3K9me3	39	30 (67)
Joven	H3k4me2	60	60 (100)
Vieja	H3K4me2	65	60(100)
Joven	H4K20me2	32	32 (100)
Vieja	H4K20me2	28	24(81)
Joven	H3K36me2	30	30 (100)
Vieja	H3K36me2	38	30 (75)
Joven	H3K79me2	30	30 (100)
Vieja	H3K79me2	30	15 (50)

**Tabla 1:** Cuantificación total del porcentaje de VG marcadas para la metilación de histonas H3 y H4 en distintos residuos de lisina en VG jóvenes y viejas. En esta tabla se muestra el número total de oocitos analizados con cada uno de los anticuerpos. Todos los oocitos, jóvenes y viejos, muestran metilación H3K9me2 y H3K4me2 mientras que para H3K9me3, H4K20me2, H3K36me2, H3K79me2 el porcentaje de metilación en los oocitos viejos (67%, 81%, 75%, 50%) disminuye en relación a los oocitos jóvenes (100%).

## 5. Niveles relativos de fluorescencia de H3K9me2 y H3K4me2 en VG jóvenes y viejas

Al no observarse diferencias en la presencia de la metilación H3K9me2 y H3K4me2 entre oocitos jóvenes y viejos, se cuantificaron los niveles relativos de fluorescencia. Los resultados muestran niveles similares de fluorescencia entre VG jóvenes y viejas (Figura 10).

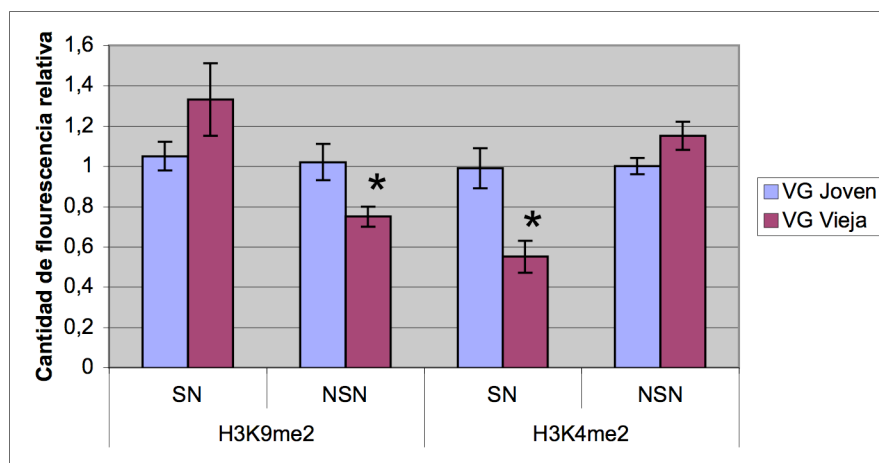


**Figura 10:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia H4K9me2 y H3K4me2 en VG jóvenes y viejas. Las VG de hembras viejas y jóvenes muestran que los niveles relativos de fluorescencia para la metilación H3K9me2 y H3K4me2 son similares. El

promedio del valor de VG jóvenes fue expresado como 1 y el valor de las VG viejas fue expresado por valores relativos a este valor. La barra representa el ES.

## 6. Niveles relativos de fluorescencia de H3K9me2 y H3K4me2 en VG de hembras viejas y jóvenes que presentan la organización de cromatina NSN y SN

Dado que los oocitos en VG muestran dos configuraciones de la cromatina, se planteo si existían diferencias en los niveles relativos de fluorescencia correspondientes a uno o ambos tipos de organización en oocitos de hembras viejas respecto a las jóvenes. Para ello, se clasificaron los niveles relativos de fluorescencia en VG de acuerdo a los dos tipos de organización, SN y NSN. Los resultados muestran que los niveles relativos de fluorescencia de metilación H3K9me2 en VG jóvenes y viejas con una organización de cromatina SN fueron similares, mientras que estos niveles disminuyeron en VG viejas que presentan la organización de cromatina NSN (Figura 11) ( $p < 0.05$ , Test T-Student). Por el contrario, los niveles relativos de fluorescencia de H3K4me2 en VG viejas con la organización SN disminuyen ( $p < 0.05$ , Test T-Student). Además, los niveles relativos de fluorescencia de metilación H3K4me2 en VG jóvenes y viejas con la organización de cromatina NSN fue similar.

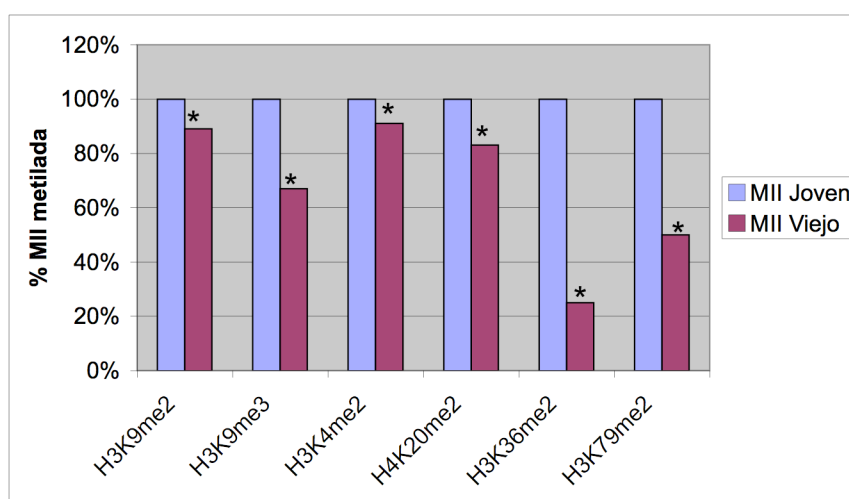


**Figura 11:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia H3K9me2 y H3K4me2 en cromatina SN, NSN de VG jóvenes y viejas. Los resultados muestran una disminución significativa de los niveles relativos de fluorescencia con respecto organización NSN (H3K9me2) y SN (H3K4me2) en VG viejas ( $p < 0.05$ , Test T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.



## 7. Metilación H3K9me2, H3K9me3, H3K4me2, H3K20me2, H3K36me2 y H3K79me2 en oocitos (MII) de hembras viejas

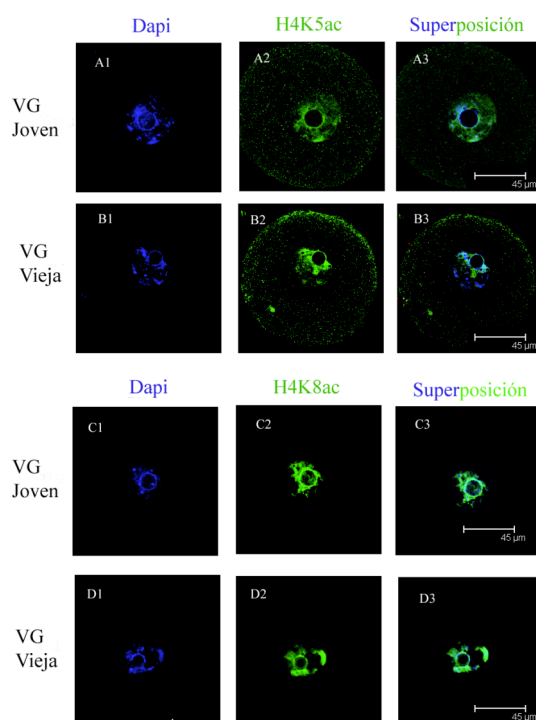
Los resultados anteriores sobre la presencia de cambios en la metilación de las histonas H3/H4 durante el estadio de VG podrían indicar la existencia de posibles alteraciones en el estadio siguiente correspondiente al estadio de MII. Para comprobarlo, se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos que reconocen H3K9me2, H3K9me3, H3K4me2, H3K20me2, H3K36me2 y H3K79me2. Los resultados muestran que el 100% de oocitos (MII) de hembras jóvenes presentan marcaje por H3K9me2, H3K9me3, H3K4me2, H3K20me2, H3K36me2 y H3K79me2, mientras que en los oocitos de hembras viejas muestran una disminución detectándose marcaje con estos anticuerpos en un 89%, 67%, 91%, 83%, 75% y 50 %, respectivamente ( $p < 0.05$ , chi cuadrado), (Figura 12).



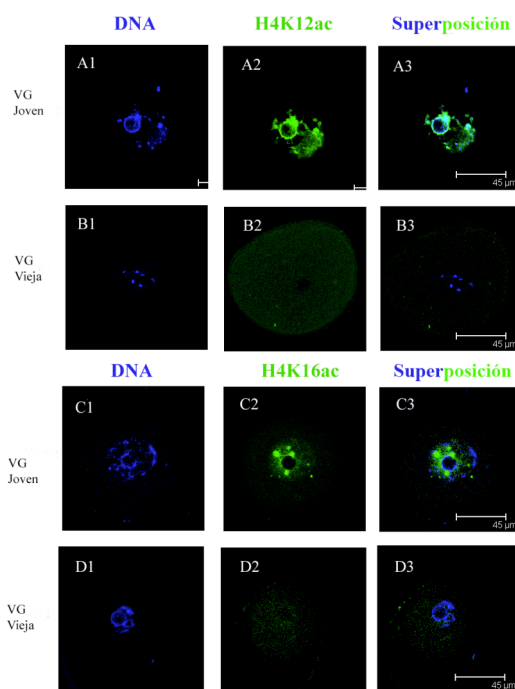
**Figura 12:** Cuantificación de MII marcadas para la metilación de las histonas H3 y H4 en distintos residuos de lisina en oocitos jóvenes y viejos. En MII de hembras viejas respecto a las jóvenes, se observó una disminución para H3K9me2, H3K9me2, H4K20me2, H3K36me2 y H3K79me2 ( $p < 0.05$ ; Test Chi-Cuadrado). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

## 8. Acetilación de la histona H4K12ac y H4K16ac en oocitos (VG) de hembras viejas.

Los resultados del análisis inmunocitoquímico muestran que los oocitos jóvenes y viejos en estadio VG presentan un marcaje positivo para los anticuerpos que reconocen H4K8ac y H4K5ac (Figura 13). Sin embargo, en el caso de los anticuerpos que reconocen H4K12ac y H4K16ac se observan diferencias entre los oocitos de hembras viejas, ya que sólo un 80% de estos oocitos presentan marcaje para H4K12ac y un 60% para H4K16ac (Figura 14, Tabla 2) ( $p < 0.05$ , chi cuadrado).



**Figura 13:** Inmunofluorescencia indirecta mostrando la distribución de H4K5ac y H4K8ac en oocitos jóvenes y viejos. (A1-D1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-H4K5ac, (C2,D2) anticuerpo anti-H4K8ac, (A3-D3) superposición de imágenes. Se detecta la presencia de señales de acetilación H4K5ac y H4K8ac en oocitos jóvenes y viejos.



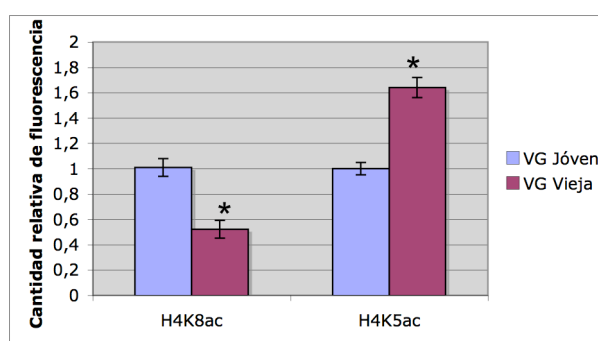
**Figura 14:** Inmunofluorescencia indirecta mostrando la distribución de H4K12ac y H4K16ac en oocitos jóvenes y viejos. (A1-D1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-H4K12ac, (C2,D2) anticuerpo anti-H4K16ac, (A3-D3) superposición de imágenes. Se detecta la presencia de señales de acetilación H4K12ac y H4K16ac en oocitos jóvenes (A2,C2) pero no en oocitos viejos (B2,D2).

VG	Acetilación	Total de oocitos	Numero de oocitos acetilados
Jóvenes	H4K8ac	52	52 (100%)
Viejos	H4K8ac	52	52 (100%)
Jóvenes	H4K5ac	64	64 (100%)
Viejos	H4K5ac	69	69 (100%)
Jóvenes	H4K12ac	68	68 (100%)
viejos	H4K12ac	75	67 (83%)
Jóvenes	H4K16ac	64	64 (100%)
Viejos	H4K16ac	90	65 (60%)

**Tabla 2:** Cuantificación total del porcentaje de VG marcadas para la acetilación de la histona H4 en oocitos jóvenes y viejos. En esta tabla se muestra el número total de oocitos analizados con cada uno de los anticuerpos. Solamente el 83% y 60% de oocitos de hembras viejas se marcaron con H4K12ac y H4K16ac, respectivamente.

### 9. Niveles relativos de fluorescencia H4K5ac y H4K8ac en oocitos (VG) de hembras viejas.

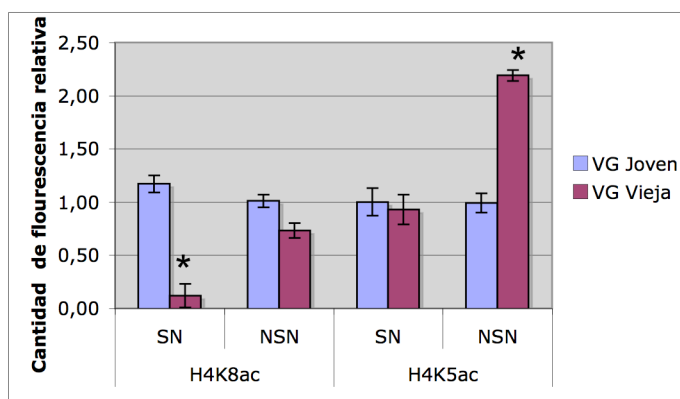
Al no encontrarse diferencias en la acetilación de la histona H4 en la lisina 8 y 5 entre oocitos jóvenes y viejos, se cuantificaron los niveles relativos de fluorescencia. Los resultados muestran una disminución significativa de los niveles relativos de fluorescencia para H4K8ac en VG viejas ( $p < 0.05$ , chi cuadrado). En contraste, los niveles de acetilación para H4K5ac aumentaron en forma significativa en VG viejas ( $p < 0.05$ , chi cuadrado) (Figura 15).



**Figura 15:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia H4K8ac y H4K5ac en VG jóvenes y viejas. Se muestra disminución y aumento significativo de los niveles relativos de fluorescencia en la acetilación H4K8 y H4K5 en VG viejas, respectivamente ( $p < 0.05$ , chi cuadrado). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

### 10. Niveles relativos de fluorescencia H4K8ac y H4K5ac en oocitos (VG) de hembras jóvenes y viejas con organización de cromatina SN y NSN.

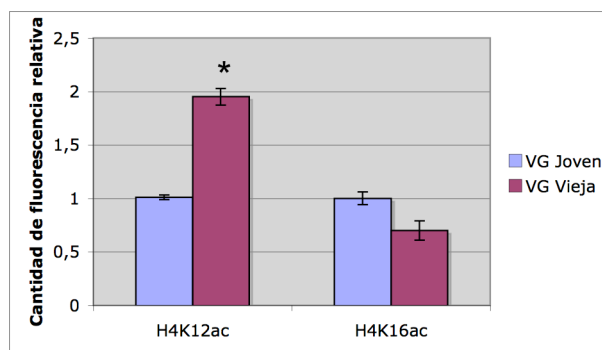
Para conocer los posibles cambios en los dos tipos de conformación de cromatina (SN y NSN), los niveles relativos de fluorescencia en VG fueron clasificados de acuerdo a los dos tipos de organización. En VG viejas, se observa disminución significativa en los niveles relativos de fluorescencia para H4K8ac en oocitos con la organización de cromatina SN y aumento significativo para H4K5ac en oocitos con la organización de cromatina NSN ( $p < 0.05$ , Test T-Student) (Figura 16).



**Figura 16:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia H4K8ac y H4K5ac en VG jóvenes y viejas presentando organización de cromatina SN y NSN. Los resultados muestran que en oocitos viejos SN hay una disminución significativa de los niveles relativos de fluorescencia H4K8ac y por el contrario, en oocitos viejos NSN un aumento significativo de los niveles relativos de fluorescencia H4K5ac ( $p < 0.05$ , Test T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

### 11. Niveles relativos de fluorescencia H4K12ac y H4K16ac en oocitos (VG) de hembras jóvenes y viejas.

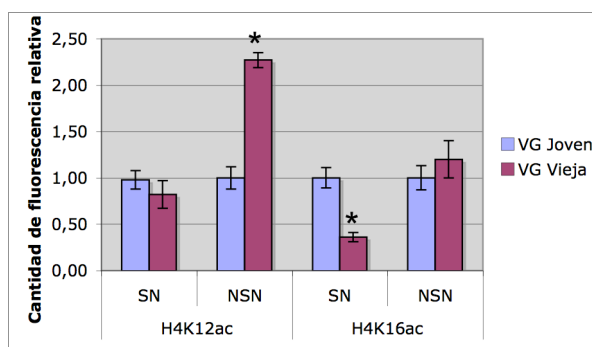
A pesar que ya se había observado una disminución significativa en la presencia de acetilación H4K12ac y H4K16ac en VG viejas, se quiso observar si en las VG viejas que están acetiladas existe diferencias entre los niveles de fluorescencia observadas con respecto a las jóvenes. Para ello se procedió a cuantificar los niveles relativos de fluorescencia de H4K12ac y H4K16ac. Los resultados muestran, niveles similares relativos de fluorescencia de H4K16ac en VG viejas y jóvenes. En contraste, se observó un aumento significativo de los niveles relativos de fluorescencia de H4K12ac en VG viejas ( $p < 0.05$ , Test T-Student) (Figura 17)



**Figura 17:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia H4K12ac y H4K16ac en VG jóvenes y viejas. Las VG de hembras jóvenes y viejas muestran niveles relativos de fluorescencia para H4K16ac similares y un aumento significativo para H4K12ac en VG viejas ( $p < 0.05$ , chi cuadrado). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

## 12. Niveles relativos de fluorescencia H4K16ac y H4K12ac en oocitos (VG) con la organización de cromatina SN y NSN de hembras jóvenes y viejas

Para conocer los posibles cambios en los dos tipos de conformación de cromatina en VG (SN y NSN), los niveles relativos de fluorescencia H4K12ac y H4K16ac se clasificaron de acuerdo a estos dos tipos de organización. Los resultados muestran que existen niveles similares de H4K12ac en la organización de cromatina SN en VG jóvenes y viejas, mientras que se observa una disminución significativa en la organización NSN en VG viejas ( $p < 0.05$ , Test T-Student). Se encontró una disminución significativa de los niveles de fluorescencia H4K16ac en la organización SN en VG de viejas ( $p < 0.05$ , Test T-Student), mientras que en VG jóvenes y viejas con la organización NSN los niveles fueron similares (Figura 18).

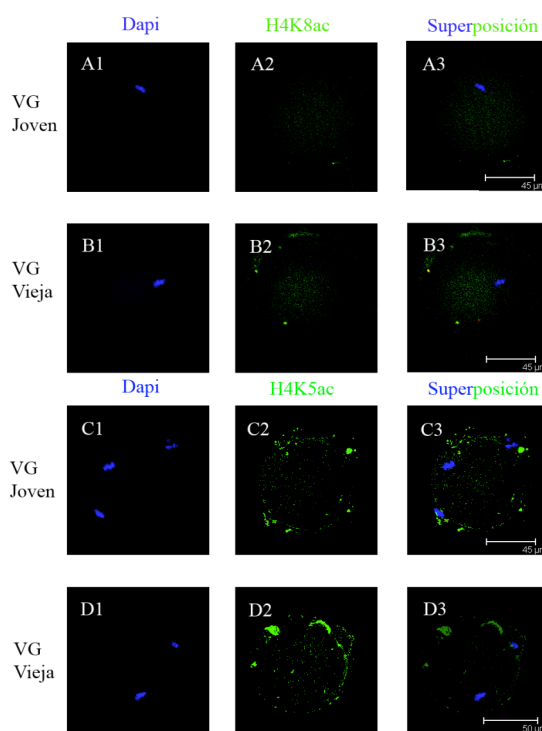


**Figura 18:** Cuantificación de los niveles de relativos de fluorescencia H4K12ac y H4K16ac en oocitos (VG) con la organización de cromatina SN y NSN de hembras jóvenes y viejas. Los resultados muestran una aumento significativo de los niveles relativos de fluorescencia en la organización NSN (H4K12ac) y una disminución significativa en la

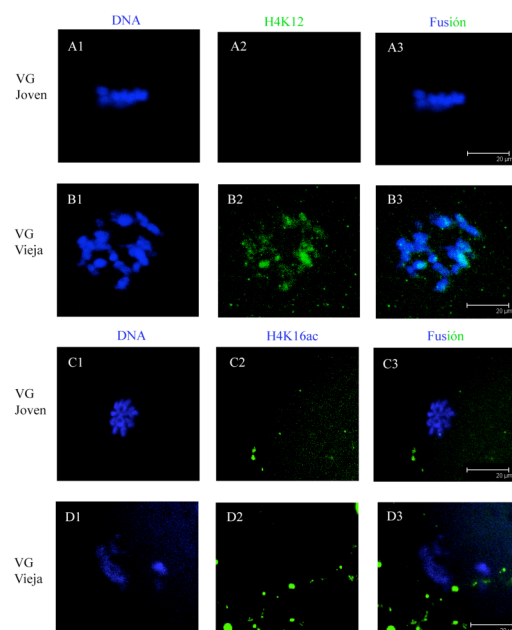
organización SN (H4K16ac) en VG viejas ( $p < 0.05$ , Test T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

### 13. Acetilación H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac y H4K16 en oocitos (MII) de hembras jóvenes y viejas

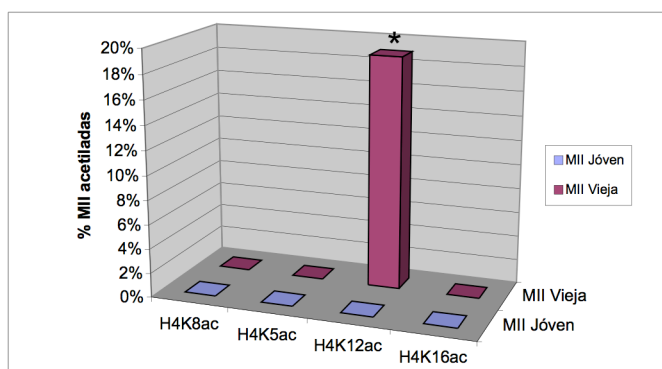
Los cambios observados durante el estadio de VG podrían generar alteraciones en el estadio de MII. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos que reconocen H4K5ac, H4K12ac, y H4K16ac. Los resultados muestran que el 100% de oocitos (MII) de hembras jóvenes no presentan marcaje para H4K8ac, H4K5ac, H4K12ac y H4K16ac en MII, mientras que los oocitos de hembras viejas presentan marcaje positivo para H4K12ac en 19% ( $p < 0.05$ , chi cuadrado) (Figura 19, 20 y 21).



**Figura 19:** Inmunofluorescencia indirecta mostrando la distribución de H4K8ac y H4K5ac en oocitos jóvenes y viejos en estadio de metafase II (MII). (A1-D1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-H4K8ac, (C2,D2) anticuerpo anti-H4K5ac, (A3-D3) superposición de imágenes. No se detecta presencia señales H4K5ac y H4K8ac en oocitos jóvenes (A2,C2) y viejos (B2,D2).



**Figura 20:** Inmunofluorescencia indirecta mostrando la distribución de H4K12ac y H4K16ac en oocitos jóvenes y viejos en estadio de metafase II (MII). (A1-D1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-H4K12ac, (C2,D2) anticuerpo anti-H4K16ac, (A3-D3) superposición de imágenes. No se detecta la presencia de señales de acetilación en H4K16ac en oocitos jóvenes y viejos. (C2,D2). Sin embargo, los oocitos viejos H4K12ac presentan marcaje con los anticuerpos (B2).

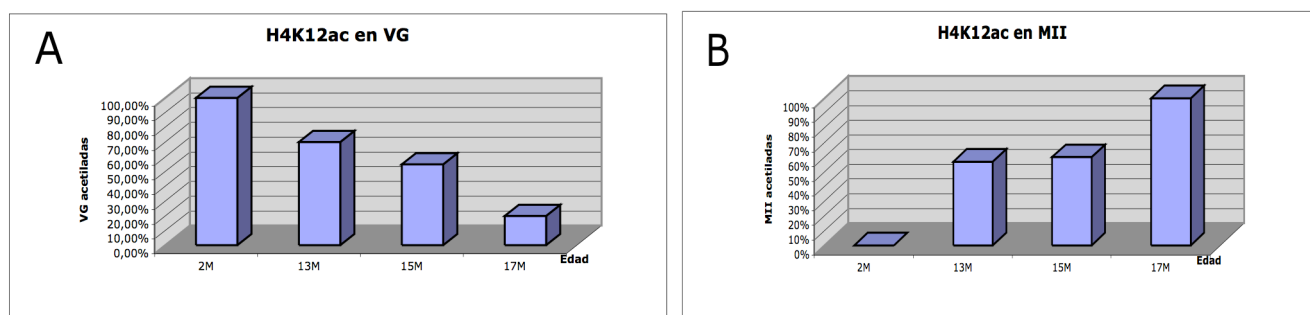


**Figura 21:** Cuantificación del porcentaje de oocitos en MII de hembras jóvenes y viejas. Mientras que todas las MII jóvenes no presentan acetilación, en las MII viejas la ausencia de acetilación aumentó significativamente en H4K12ac, H4K16ac en un 19 y 17% respectivamente ( $p < 0.05$ , chi cuadrado). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.



#### 14. Acetilación H4K12ac en oocitos (VG y MII) de hembras viejas de diferentes edades.

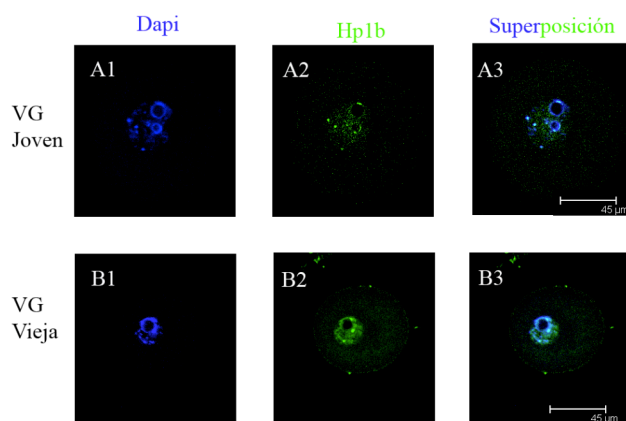
Para asegurarnos que los cambios que observamos en la acetilación de la histona H4 se relacionaban directamente con la edad, se analizaron hembras viejas de diferentes edades. Se observa la presencia de acetilación para H4K12ac en VG y MII de oocitos jóvenes y viejos. Las VG jóvenes presentan acetilación H4K12ac en un 100% y a medida que la edad avanza las VG muestran una disminución H4K12ac. Por el contrario, en el caso de oocitos en MII, que en jóvenes no presentan acetilación H4K12ac, esta modificación de histona aumenta con la edad (Figura 22).



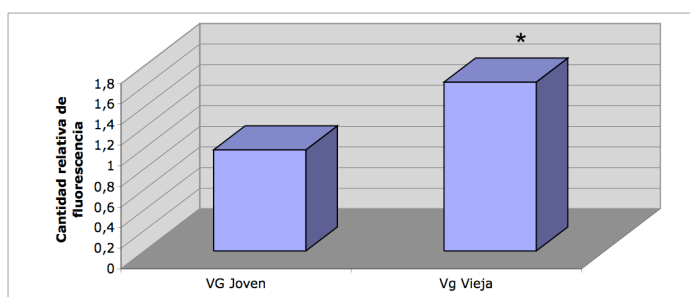
**Figura 22:** Cuantificación del porcentaje de oocitos viejos acetilados para H4K12 en estadio de VG y MII. Se clasificaron los oocitos de hembras viejas de acuerdo a su edad. El porcentaje de acetilación H4K12 disminuye en VG (A) y aumenta en MII (B) con la edad.

#### 15. Niveles relativos de fluorescencia de la proteína HP1 $\beta$ en VG de hembras viejas

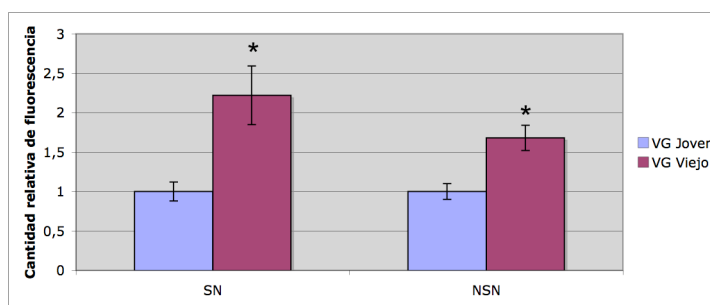
Dado que la disminución de la proteína HP1 $\beta$  se correlaciona con niveles elevados de dimetilación de la histona H3 en la *Lys9* (H3K9me2), se analizó si las variaciones de H3K9me2 observadas en hembras viejas se correlacionan con variaciones en la presencia de HP1 $\beta$ . Para ello, mediante inmunofluorescencia y usando el anticuerpo contra HP1 $\beta$  se analizó la presencia de esta proteína en VG de oocitos viejos y jóvenes detectándose un aumento de los niveles de HP1 $\beta$  en oocitos de hembras viejas (Figura 23). A continuación, se cuantificaron los niveles relativos de fluorescencia de la proteína HP1 $\beta$  observándose que está aumentada en oocitos de hembras viejas con respecto a jóvenes (Figura 24). Seguidamente, se analizaron los niveles relativos de fluorescencia en la proteína HP1 $\beta$  en VG con cromatina SN y NSN. Los resultados muestran un aumento significativo de los niveles relativos de fluorescencia de HP1 $\beta$  en los dos tipos de distribución (SN y NSN) de VG viejas ( $p < 0.01$ , Test T-Student) (Figura 25).



**Figura 23:** Distribución de la proteína HP1 $\beta$  en VG jóvenes y viejas. A1-B1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo HP1 $\beta$ , (A3-B3) superposición de imágenes. Se observa marcaje de la proteína HP1 $\beta$  en los oocitos de hembras jóvenes (A) y viejas (B).



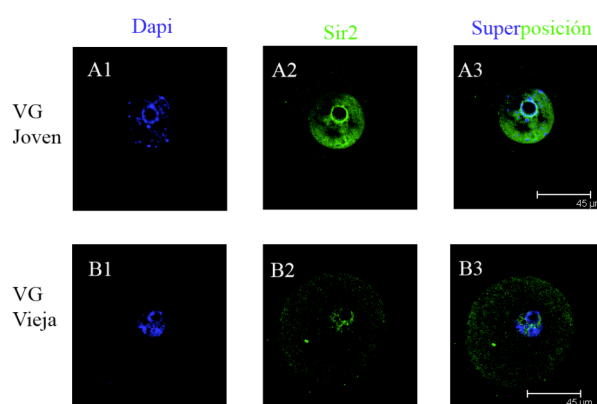
**Figura 24:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de la proteína HP1 $\beta$  en VG jóvenes y viejas. Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles de fluorescencia de HP1 $\beta$  en VG viejas ( $p < 0.01$ , Test T-Student). El \* indica diferencia significativa.



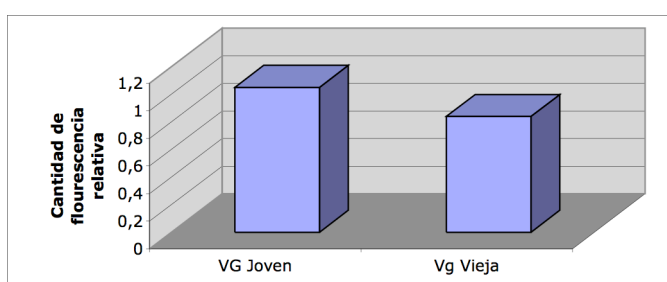
**Figura 25:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de la proteína HP1 $\beta$  en VG jóvenes y viejas con organización de cromatina SN y NSN. Se observa un aumento significativo en las configuraciones SN y NSN en VG viejas ( $p < 0.01$ , Test T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

## 16. Niveles relativos de fluorescencia de la proteína SIR2 en VG de hembras viejas

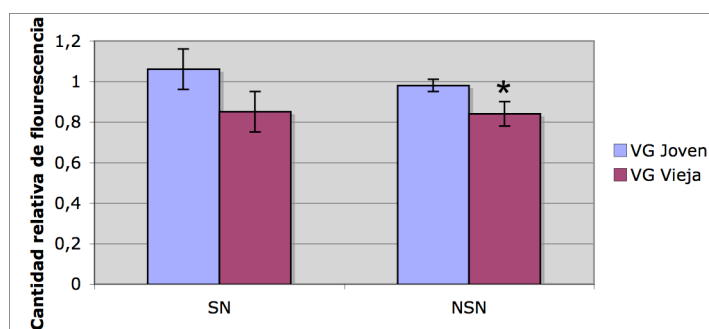
SIR2 es una deacetilasa que regula la deacetilación de la histona H4 en la *Lys16* (Chianti et al 2006). Por ello, se quiso averiguar si la ausencia de acetilación H4K16 en VG viejas podría relacionarse con una disminución en la presencia de la proteína SIR2. Para ello se realizó inmunofluorescencia con anticuerpos que específicamente reconocen SIR2. Los resultados de este análisis muestran que SIR2 está presente tanto en VG jóvenes como viejas (Figura 26). A continuación, realizamos la cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de SIR2 observando que estos tampoco variaron de forma significativa en hembras viejas (Figura 27). También, analizamos los posibles cambios de los niveles de la proteína SIR2 en VG en relación a la organización de cromatina SN y NSN. Se observa una disminución significativa en los niveles relativos de fluorescencia de la proteína SIR2 en el tipo de distribución NSN de VG viejas ( $p < 0.01$ , Test T-Student) (Figura 27).



**Figura 26:** Distribución de la proteína SIR2 en VG jóvenes y viejas. A1-B1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-SIR2, (A3-B3) superposición de imágenes. Se observa marcaje positivo en los oocitos de hembras viejas (B) y de hembras jóvenes (A).



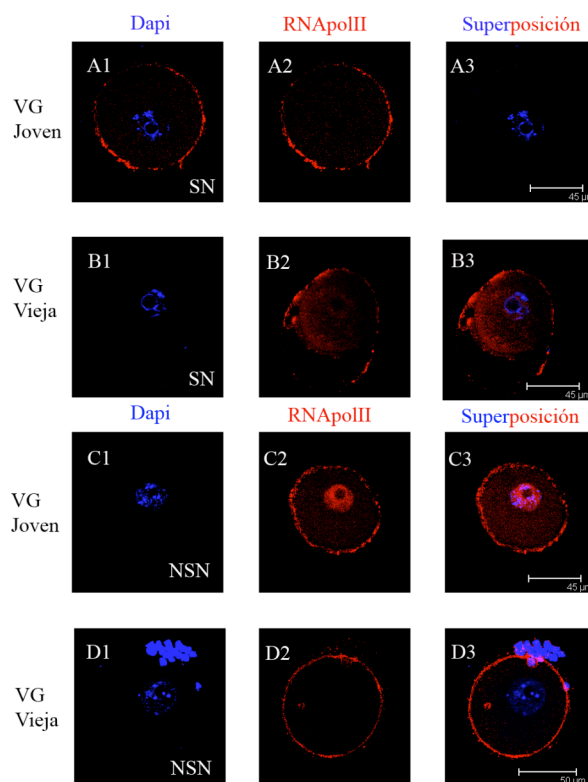
**Figura 27:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de la proteína SIR2 en VG jóvenes y viejas. No se observan cambios en los niveles relativos de fluorescencia de SIR2 en VG de hembras viejas.



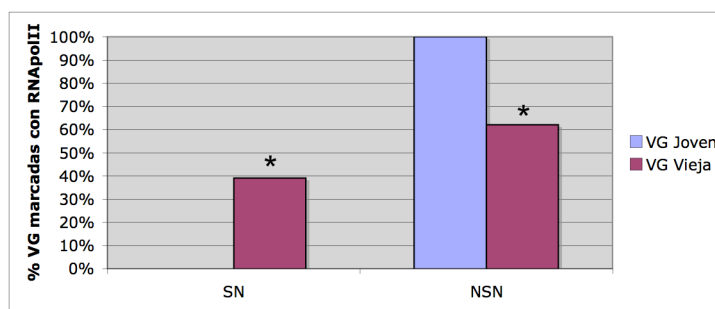
**Figura 28:** Cuantificación de los niveles relativos de fluorescencia de la proteína SIR2 en VG de hembras viejas y jóvenes presentando la organización de la cromatina NSN y SN. Se observa una disminución significativa en los niveles relativos de fluorescencia para las configuraciones NSN en VG viejas ( $p < 0.01$ , Test T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

### 17. Presencia de RNAPolIII en oocitos (VG) de hembras jóvenes y viejas

La hipoacetilación de la histona H4 en VG viejas podría estar relacionada con modificaciones en la síntesis de RNA en el estadio de VG. Por tal motivo, nos propusimos averiguar si existían variaciones en la síntesis de RNAm. Dado que la RNAPolIII se correlaciona con la síntesis de RNAm, nos propusimos analizar su presencia en VG jóvenes y viejos. Mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconoce RNAPolIII, observamos que en VG los oocitos jóvenes no presentaron marcaje en la organización SN, mientras que oocitos viejos presentaron marcaje en un 39% (Figura 29). Por otra parte, mientras que el 100% de las VG de oocitos jóvenes en NSN presentan marcaje, solamente un 62% de los viejos se marcaron (Figura 30). Estos datos nos sugieren que la síntesis de RNA esté posiblemente alterada en oocitos viejos. ( $p < 0.05$ , chi cuadrado).



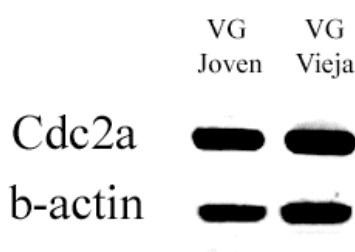
**Figura 29:** Distribución de RNAPIII en VG jóvenes y viejas. VG jóvenes y viejas fueron marcadas con el anticuerpo RNAPIII. (A1-D1) Tinción con Dapi, (A2, D2) anticuerpo anti-RNAPIII, (A3D3) superposición de imágenes. Las VG jóvenes con organización SN no muestran señal para la RNAPIII (A2), las VG viejas presentan un débil marcaje (B2). En VG jóvenes con la organización de cromatina NSN se observa la presencia de RNAPIII (C2), pero no en VG de hembras viejas con la organización NSN (D2).



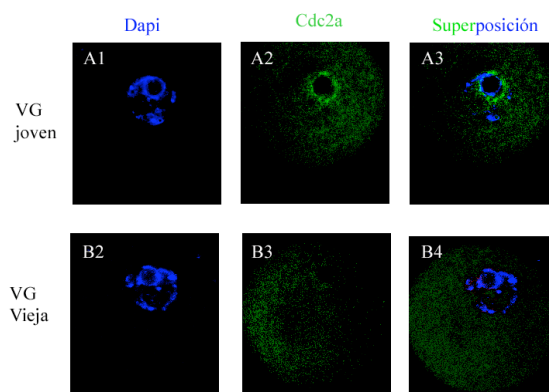
**Figura 30:** Cuantificación del porcentaje de VG marcadas con anti-RNAPIII en oocitos jóvenes y viejos con organización de cromatina SN y NSN. La RNAPIII no se detecta en VG jóvenes con organización de cromatina SN pero sí en VG viejas ( $p < 0.05$ , Chi cuadrado). El \* indica diferencia significativa.

## 18. Expresión del gen *Cdc2a* en oocitos (VG) de hembras jóvenes y viejas

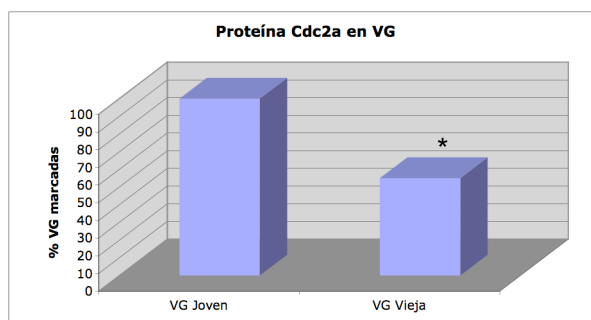
Teniendo en cuenta los cambios observados en la acetilación y metilación de histna H3/H4 asi como en la presencia de RNAPolIII en VG viejas, quisimos analizar la expresion del gen *Cdc2*. La expresión del gen *Cdc2a* esta correlacionada con la acetilación de la histona H4 en la *Lys12* (Minuzo et al 2004). Mediante RT-PCR no se observan diferencias en el RNAm del gen *Cdc2a* en VG jóvenes y viejas (Figura 31). Por otro lado, mediante inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo que reconoce la proteína Cdc2a observamos una evidente disminución de la señal en los oocitos (VG) de hembras viejas (Figura 32, Figura33).



**Figura 31:** Cuantificación de la expresión de *Cdc2a* mediante RT-PCR en VG de hembras jóvenes y viejas. La expresión del gen *Cdc2a* es similar en VG jóvenes y viejas. Se utilizó como control el gen  $\beta$ -actina.



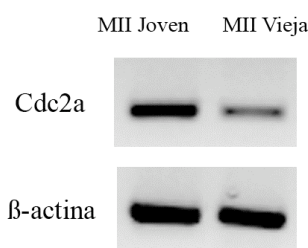
**Figura 32:** Distribución de la proteína Cdc2a en VG jóvenes y viejas. (A1-B1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-Cdc2a, (A3-B3) superposición de imágenes. Se observa claramente la disminución del marcaje en los oocitos de hembras viejas (B) con respecto a oocitos de hembras jóvenes (A).



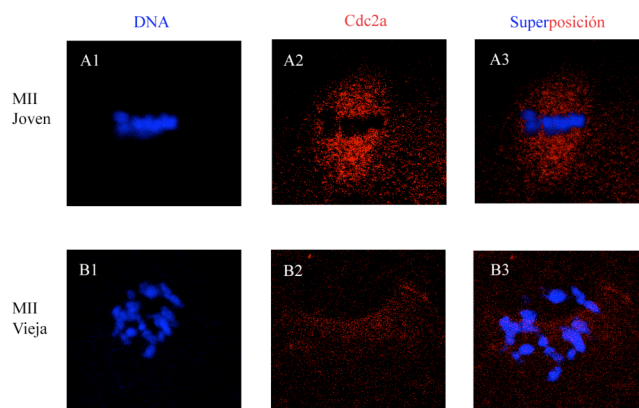
**Figura 33:** Cuantificación del porcentaje de oocitos jóvenes y viejos con la presencia de la proteína Cdc2a. El 100% de VG jóvenes presentan marcaje con el anticuerpo anti-Cdc2a, mientras que sólo en un 55% de VG viejas se detecta señal positiva ( $p < 0.05$ , Chi cuadrado). El \* indica diferencia significativa.

### 19. Expresión del gen *Cdc2a* en oocitos (MII) de hembras jóvenes y viejas

Nos propusimos analizar la expresión de *Cdc2a* en oocitos en estadio de MII (estadio posterior al de VG). Por ello, se realizó un ensayo de RT-PCR que mostró claramente que existe una disminución del RNAm del gen *Cdc2a* en los oocitos en estadio de MII de hembras viejas (Figura 34). Paralelamente, mediante inmunofluorescencia indirecta se observa una clara disminución en la presencia de la proteína Cdc2a en MII de oocitos viejos en MII (Figura 35).



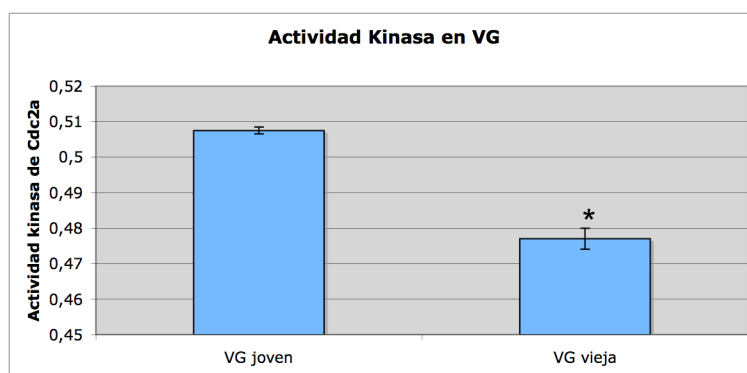
**Figura 34:** Cuantificación de la expresión de *Cdc2a* en MII de hembras jóvenes y viejas mediante RT-PCR. Se observa una menor expresión del gen *Cdc2a* en MII viejas con respecto a las jóvenes. Se utilizó como control el gen  *$\beta$ -actina*.



**Figura 35:** Distribución de la proteína Cdc2a en oocitos en MII de hembras jóvenes y viejas. (A1-B1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) anticuerpo anti-Cdc2a, (A3-B3) superposición de imágenes. Los MII jóvenes (A) muestran señal intensa para Cdc2a y no así en los oocitos en MII viejas (B).

## 20. Actividad Kinasa de la proteína Cdc2a en oocitos (VG) de hembras viejas

Dado que la presencia de la proteína Cdc2a cambia en oocitos VG de hembras viejas se quiso analizar si su actividad kinasa también se veía modificada. Los resultados de este análisis muestran que las VG viejas presentan menores niveles de actividad kinasa que las VG jóvenes (Figura 36).

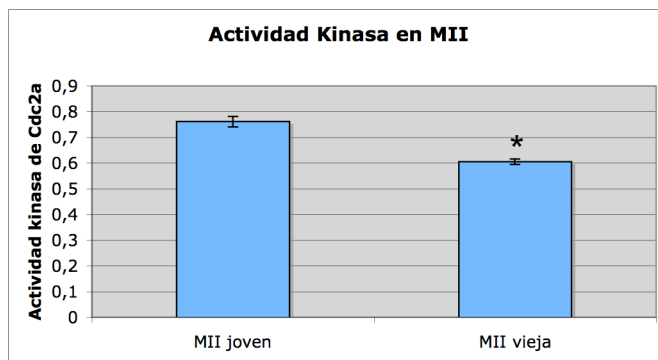


**Figura 36:** Cuantificación de la actividad kinasa de Cdc2a en VG de hembras viejas y jóvenes. Los resultados muestran disminución en los niveles de actividad kinasa en VG viejas ( $p < 0,05$ , T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.



## 21. Actividad Kinasa en oocitos (MII) de hembras jóvenes y viejas

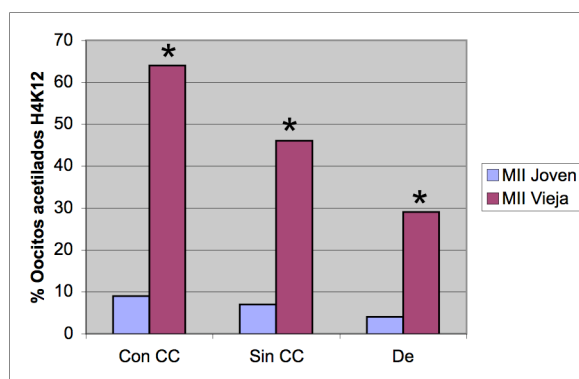
Debido a que se observó una disminución de la actividad kinasa de Cdc2a en el estadio de VG, se quiso saber si esta actividad también disminuía en el estadio posterior de MII. Para ello se hizo un ensayo de actividad kinasa de oocitos en MII. Los resultados muestran disminución de dicha actividad en MII viejas (Figura 37).



**Figura 37:** Cuantificación de la actividad kinasa de la proteína Cdc2 en MII de hembras jóvenes y viejas. Se observa una disminución en los niveles de actividad kinasa de Cdc2a en MII viejas ( $p < 0.05$ , Test T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.

## 22. Acetilación H4K12ac en oocitos jóvenes y viejos (MII) obtenidos de cultivos de VG.

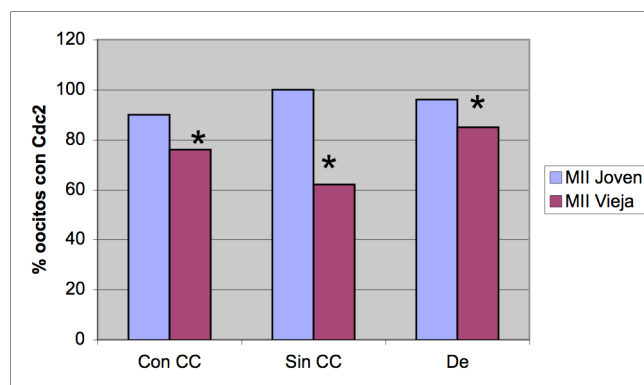
Debido a que la presencia de acetilación H4K12ac disminuye en VG viejas y aumenta en el estadio de MII se quiso saber si estos cambios eran reproducibles cuando la maduración del oocito se realizaba mediante un cultivo *in vitro*. Para ello, se realizaron cultivos de VG jóvenes y viejas hasta el estadio de MII. Los resultados muestran que después de 17 h de cultivo aumentaba la acetilación H4K12 en VG viejas con respecto a las jóvenes. Mayores porcentajes de acetilación fueron observados en VG viejas que se habían cultivado con células del cumulus (Figura 38).



**Figura 38:** Cuantificación del porcentaje de oocitos acetilados en MII de hembras viejas y jóvenes obtenidos en cultivos *in vitro* (17h). Estos cultivos se realizaron a partir de tres tipos de VG obtenidas del ovario. VG con células del cumulus: “Con CC”, VG que se colectaron del ovario sin CC: “Sin CC” y VG a las que se les quito las células del cumulus antes de empezar el cultivo: “De”. La acetilación H4K12 aumenta en oocitos en MII viejas cultivados *in vitro*. El \* indica diferencia significativa.

### 23. Proteína Cdc2a en MII jóvenes y viejas obtenidas de cultivos de VG

También investigamos si la disminución de los niveles de proteína Cdc2a en MII de hembras viejas era reproducible cuando los oocitos en VG procedían de cultivos *in vitro*. Tal como observamos *in vivo*, después de 17h de cultivo, se observa una disminución de la presencia de Cdc2a en VG de hembras viejas con respecto a las jóvenes (Figura 39).

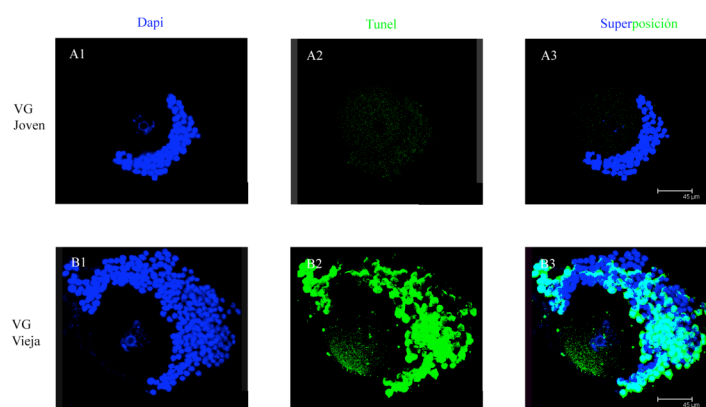


**Figura 39:** Cuantificación del porcentaje de oocitos con la proteína Cdc2a en MII de hembras viejas y jóvenes obtenidos de cultivos *in vitro* (17h). Estos cultivos se realizaron a partir de tres tipos de VG obtenidas del ovario. VG con células del cumulus: “Con CC”, VG que se colectaron del ovario sin CC: “Sin CC” y VG a las que se les quito las células del cumulus antes de empezar el cultivo: “De”. La presencia de Cdc2a disminuye en MII viejas obtenidas mediante cultivos *in vitro*. El \* indica diferencia significativa.

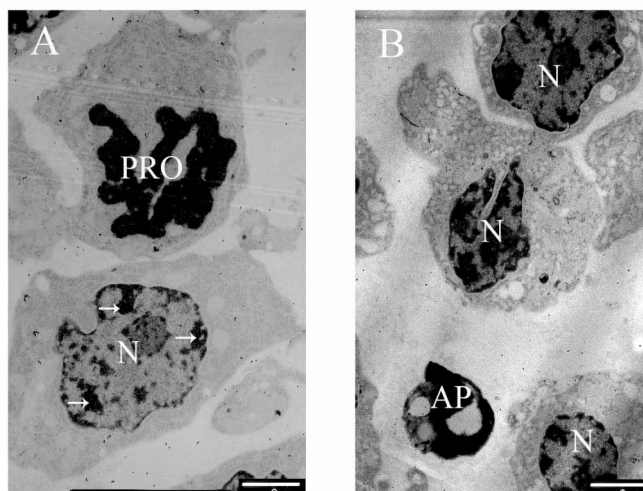
## 24. Apoptosis en células del cumulus de hembras viejas.

Por otro lado, estudiamos si las células del cúmulo sufrían apoptosis debido a la vejez. Para ello se realizó la técnica del TUNEL, la cual mostró que mientras las células del cúmulo de hembras jóvenes presentaban solo un 5% de apoptosis, las de hembras viejas presentaban un 40% de apoptosis (Figura 40).

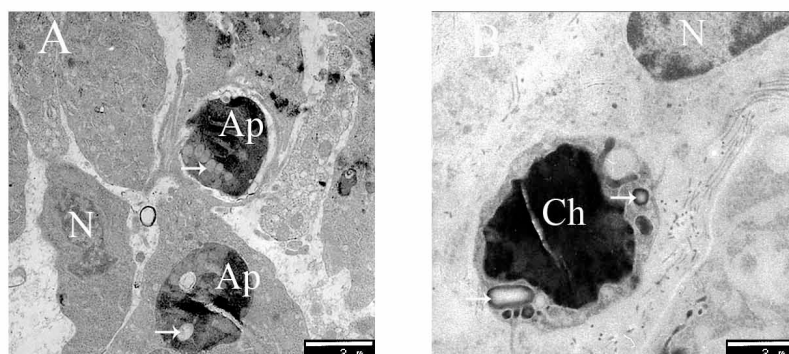
Las observaciones realizadas mediante fluorescencia con la técnica TUNEL fueron confirmadas empleando la microscopía electrónica. Mediante esta metodología, se observaron claramente las características de las células normales que muestran un núcleo ovalado en el cual se aprecian uno o dos nucleolos. La cromatina en estos núcleos aparece constituida por muchas zonas densas que están ocasionalmente asociadas a la membrana nuclear, libres en el nucleoplasma o rodeando al nucleolo. Las células apoptóticas presentaron las características ultraestructurales típicas de esta alteración, descrita en varias ocasiones y tipos celulares (Vermeulen et al 2005 ). El núcleo apoptótico muestra diversas formas, destacándose fundamentalmente una gran heterocromatinización. Estos núcleos hipercromáticos muestran formas variadas, apareciendo a veces lobulados y conteniendo además vacuolas o restos membranosos (Figuras 41 y 42).



**Figura 40:** Apoptosis en células del cúmulo de hembras jóvenes y viejas. (A1-B1) Tinción de DNA con DAPI, (A2,B2) marcaje con TUNEL, (A3-B3) superposición de imágenes. Se observan claramente las diferencias de marcaje en las células del cúmulo de hembras viejas (B2) con respecto a células del cúmulo de hembras jóvenes (A2).



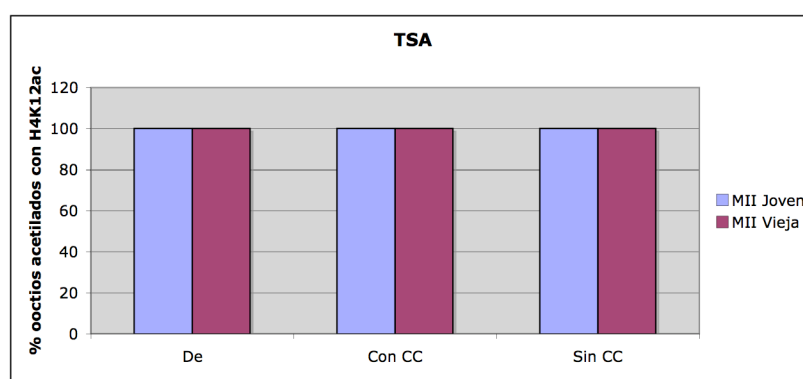
**Figura 41:** Células del cumulus oophorus. Cortes finos de ovarios de hembras viejas teñidos mediante la técnica del PTA alcohólico. A) Se observan dos células, una de las cuales aparece en prometafase (PRO) mostrando sus cromosomas como estructuras de alta densidad a los electrones. La célula inferior muestra un núcleo normal con una gran cantidad de regiones heterocromáticas. Estas aparecen asociadas a la membrana nuclear (flechas), dispersas por el nucleoplasma o rodeando al nucleolo (4000X). B) Se aprecian varias células del cumulus con núcleos normales (N) y un núcleo claramente apoptótico (AP) que se muestra muy heterocromático y vacuolizado (5000X).



**Figura 42:** Células del cúmulus oophorus de una hembra vieja. A) Tinción con Uranilo-Plomo; B) Tinción con PTA alcohólico. A) Aparecen varias células con un núcleo normal (N) y dos estructuras muy densas y vacuolizadas (flechas) características del proceso apoptótico (AP)(5000X). B) Núcleo apoptótico de una célula del cumulus oophorus. Se observa la cromatina formando una masa muy densa y compacta y en el citoplasma diversas estructuras que podrían representar vacuolas o inclusiones (flechas). N: Núcleo de una célula de cumulus normal (4000X).

## 25. Efecto de la Tricostatina A (TSA) sobre la acetilación H4K12 en MII jóvenes y viejas obtenidas de cultivos de VG

Se sabe que la Tricostatina A (TSA) es un inhibidor de deacetilasas. Las investigaciones de Aoki y col (2003) han mostrado que durante la maduración *in vitro* con TSA los oocitos permanecen acetilados en estadio de MII. Quisimos averiguar si este mecanismo de hiperacetilación por inhibición de deacetilasas también ocurría en oocitos viejos. Para ello, oocitos jóvenes y viejos fueron cultivados *in vitro* en presencia de este inhibidor. Los resultados muestran que los oocitos jóvenes y viejos se encuentran en un 100% acetilados con H4K12ac (Figura 43).



**Figura 43:** Cuantificación del porcentaje de oocitos acetilados para H4K12 de hembras jóvenes y viejas obtenidos de cultivos *in vitro* con TSA(17h). Estos cultivos se realizaron a partir de tres tipos de VG obtenidas del ovario. VG con células del cumulus: “Con CC”, VG que se colectaron del ovario sin CC: “Sin CC” y VG a las que se les quito las células del cumulus antes de empezar el cultivo: “De”. Se obtuvieron patrones de acetilación H4K12 similares en oocitos jóvenes y viejos.

## 26. Efecto del TSA sobre la presencia de la proteína Cdc2a en MII jóvenes y viejas obtenidas de cultivos de VG

Los resultados anteriores muestran que tras el cultivo de VG hasta oocitos MII, los oocitos jóvenes están acetilados en H4K12ac. Esta acetilación H4K12 estudiada en cultivo de células de ratón fue correlacionada con la expresión del gen Cdc2a (Minuzo et al 2004). Para analizar si en nuestro caso ocurre esta correlación, se realizaron cultivos *in vitro* de oocitos en presencia de TSA. Los resultados muestran que los oocitos jóvenes cultivados

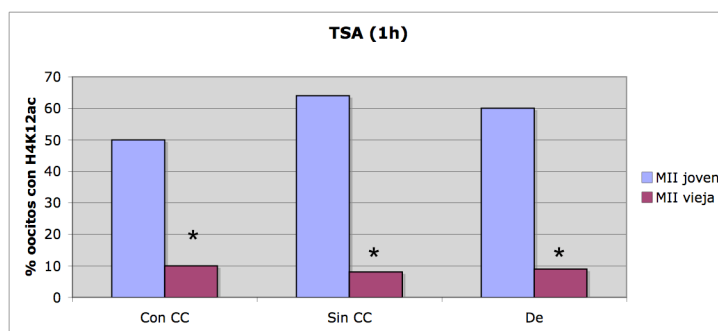
conCC, sinCC y De presentan la proteína Cdc2a en un 60%, 100% y 100% respectivamente. Sin embargo, en oocitos viejos esta proteína Cdc2a está presente en un 100%, 50% y 50%, respectivamente (Figura 44).



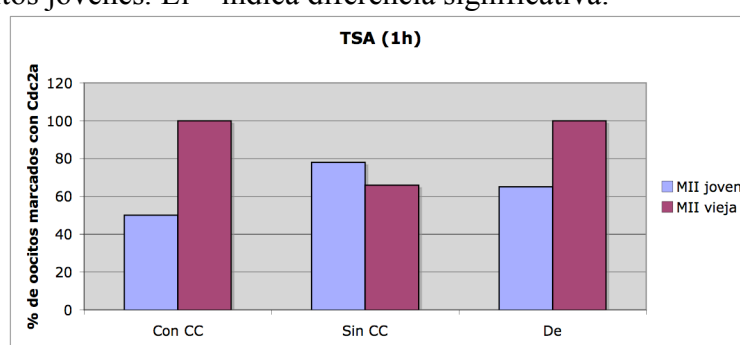
**Figura 44:** Cuantificación del porcentaje de oocitos que presentan la proteína Cdc2a de hembras viejas y jóvenes cultivados *in vitro* con TSA (17h). Estos cultivos se realizaron a partir de tres tipos de VG obtenidas del ovario. VG con células del cumulus: “Con CC”, VG que se colectaron del ovario sin CC: “Sin CC” y VG a las que se les quito las células del cumulus antes de empezar el cultivo: “De”. Se observó disminución en la presencia de Cdc2a en oocitos con CC de hembras jóvenes y viejas.

## 27. Efecto del TSA por una hora (1h) , en MII jóvenes y viejas obtenidas de cultivos de VG

Dado que los oocitos viejos se muestran deacetilados para H4K12 en estadio de VG. Se intentó revertir la hipometilación. Para ello, estos oocitos fueron tratados con TSA durante la primera hora de cultivo, es decir durante el estadio de VG. Los resultados muestran que este tratamiento transitorio con TSA fue capaz de corregir la hiperacetilación de oocitos viejos en MII. Sin embargo, sorprendentemente, este tratamiento indujo la hiperacetilación de oocitos jóvenes en MII (Figura 45).



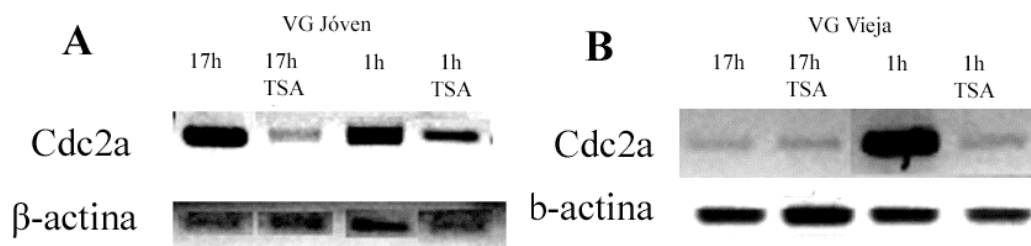
**Figura 45:** Cuantificación de H4K12ac en oocitos jóvenes y viejos madurados *in vitro* por 1h con TSA y seguido de un cultivo de 16h sin TSA. Estos cultivos se realizaron a partir de tres tipos de VG obtenidas del ovario. VG con células del cumulus: “Con CC”, VG que se colectaron del ovario sin CC: “Sin CC” y VG a las que se les quito las células del cumulus antes de empezar el cultivo: “De”. La acetilación H4K12ac disminuye en oocitos viejos y aumenta en oocitos jóvenes. El \* indica diferencia significativa.



**Figura 46:** Cuantificación de la proteína Cdc2a en oocitos jóvenes y viejos madurados *in vitro* hasta MII por 1h con TSA y seguido de un cultivo de 16h sin TSA. Estos cultivos se realizaron a partir de tres tipos de VG obtenidas del ovario. VG con células del cumulus: “Con CC”, VG que se colectaron del ovario sin CC: “Sin CC” y VG a las que se les quito las células del cumulus antes de empezar el cultivo: “De”. Mientras que los oocitos viejos muestran aumento en la presencia de la proteína Cdc2a, los oocitos jóvenes muestran una disminución de dicha proteína.

## 28. Expresión del gen *Cdc2a* en oocitos jóvenes y viejos cultivados con TSA

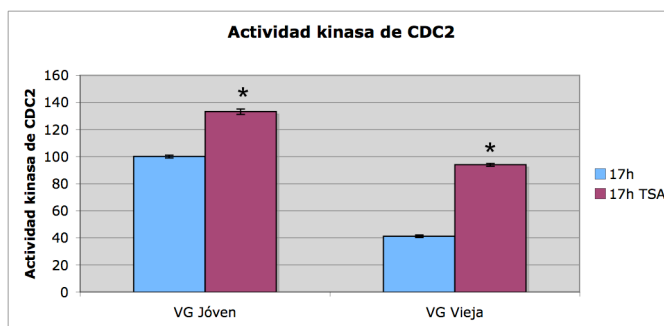
Para analizar el efecto del TSA sobre la expresión del gen *Cdc2a* durante la maduración *in vitro* después de 1h y 17h de tratamiento. La RT-PCR demostró claramente una disminución del RNAm del gen *Cdc2a* en los oocitos jóvenes tratados por 1h y 17h con TSA (Figura 47A). En cuanto los oocitos de ratones viejos, al cabo de 1h se observa una disminución clara entre los oocitos tratados con TSA respecto a los no tratados (Figura 47B).



**Figura 47:** Cuantificación de la expresión del gen *Cdc2a* en oocitos de hembras jóvenes y viejas tratados con TSA durante la maduración *in vitro* (1h y 17h). La maduración *in vitro* fue realizada durante 17h en ausencia de TSA (17h), en presencia de TSA (17h TSA); durante 1h en ausencia de TSA (1h) y en presencia de TSA (1h TSA). Se observa una menor expresión del gen *Cdc2a* en oocitos jóvenes tratados con TSA durante 1h y 17h (A). Los oocitos viejos muestran similar disminución de RNAm que los jóvenes después de 1h de tratamiento pero no así después de 17h (B). Se utilizó como control la muestra de  $\beta$ -actina.

## 29. Disminución de la actividad Kinasa en oocitos jóvenes y viejos cultivados con TSA

Debido a que el tratamiento con TSA modificó la expresión y la proteína del gen *Cdc2a*, quisimos investigar qué pasaba con la actividad kinasa de Cdc2a. Para ello, se realizó el ensayo dicha actividad en oocitos tratados con TSA durante 17h. Los resultados muestran una disminución de actividad kinasa de Cdc2a en oocitos jóvenes y viejos tratados con TSA durante 17h (Figura 48).



**Figura 48:** Cuantificación de la actividad kinasa de la proteína Cdc2 en MII de hembras viejas y jóvenes tratados con TSA durante 17h. Actividad kinasa de oocitos madurados *in vitro* durante 17h en ausencia de TSA (17h) y en presencia de TSA (17h TSA). Se muestra una disminución significativa en oocitos jóvenes y viejos tratados con 17h TSA ( $p < 0.05$ , Test T-Student). La barra representa el ES. El \* indica diferencia significativa.



## DISCUSIÓN

El fenómeno del envejecimiento es un factor que altera de una u otra forma a la gran mayoría de los tejidos (Richardson and Cheung, 1982). En los tejidos reproductores la vejez produce una serie de cambios que conducen gradualmente a la pérdida de la capacidad reproductiva. Esta pérdida es más evidente en el aparato reproductor femenino que en el masculino (Carnevale, 2008; Reinhardt, 2007). En este último la capacidad reproductiva se pierde muy gradualmente, mientras que en el femenino de ciertos grupos zoológicos ocurre de forma drástica. Este es el caso de los Primates, en los que, según las especies y debido a cambios hormonales, ocurre la menopausia que origina la pérdida total de la fertilidad por ausencia de la ovulación (Austin and Short, 1982). Este hecho no ocurre en otros grupos de mamíferos, como en Rodentia, en los que las hembras sólo disminuyen la cantidad y calidad de óvulos con la vejez. Por ello, las hembras de los Roedores ovulan hasta morir, aunque la fertilidad de sus gametos está disminuida por diversos factores que han sido comentados ampliamente en la introducción (ver introducción, sección 2). Desde este punto de vista, el estudio de los roedores permite analizar *in vivo* la secuencia de cambios inducidos gradualmente por la vejez sobre la fertilidad del gameto, mientras que en la especie humana el análisis de los oocitos viejos muestra un cuadro donde predominan los caracteres necróticos y degenerativos.

Otro punto importante que se debe mencionar es que al disminuirse la producción de gametos fértiles en la hembra por efectos del envejecimiento, se condiciona la fertilidad de la especie permitiendo una mayor tasa de concepción en los individuos jóvenes. Este hecho está evidentemente relacionado con la capacidad para cuidar a los hijos, que en los mamíferos tienen las hembras jóvenes, un factor que controla y origina muchas situaciones relacionadas con el comportamiento y la fisiología reproductivas (Austin and Short, 1982).

Los efectos del envejecimiento sobre el gameto femenino en mamíferos han sido analizados principalmente durante la vejez postovulatoria (estadio de MII) colectando los oocitos viejos ovulados del oviducto, o también aquellos envejecidos en medios de cultivo.

Al respecto, y como se comentaba en la introducción (ver introducción, sección 2.4 y 2.5), se han realizado diferentes estudios que muestran los efectos del envejecimiento sobre los oocitos ovulados y cultivados en el ratón. Pero, son pocos los trabajos que se han dedicado a analizar los efectos del envejecimiento preovulatorio, y en particular son escasos los que lo han hecho a nivel molecular.

El envejecimiento preovulatorio se realiza analizando la vesícula germinativa (VG), que es el estadio quiescente del oocito en meiosis I (dictioteno). Hasta ahora no se conoce la razón de porqué la oogénesis en mamíferos presenta este fenómeno a diferencia de otros grupos de vertebrados donde la producción de oogonias y oocitos es continua, interrumpiéndose exclusivamente en ocasiones por efectos del fotoperiodo. Hasta este momento no se conoce el porqué de este fenómeno, pero este largo periodo que las VG permanecen en el ovario causa que ellas estén afectadas por los efectos nocivos del medio que les rodea. Uno de estos efectos es el producido por el envejecimiento como muestran los resultados de esta Tesis.

Una conclusión general que podemos sacar de nuestros resultados es que el envejecimiento preovulatorio altera una serie de características morfológicas y fisiológicas de la cromatina de la VG. Las consecuencias del envejecimiento se han estudiado en diferentes estructuras del oocito (Tarin, 2000), sin embargo los cambios ocurridos en la cromatina durante el envejecimiento preovulatorio son escasamente conocidos. Los más destacados han sido los que muestran alteraciones detectadas en los cromosomas en el estadio de Metafase II (Tarin et al., 2001), o los que se han realizado en el núcleo de embriones provenientes de oocitos envejecidos (Tarin, 2000; Tesarik, 1993). Al respecto, la alineación de los cromosomas en Metafase II parece estar regulada por factores tanto nucleares como citoplasmáticos según los experimentos realizados empleando trasplante de núcleos y ooplasma de oocitos jóvenes a viejos (Cui et al., 2005; Liu and Keefe, 2004). Durante el estadio de VG el estudio más destacado es el de Peluso et al. (1980) en el que se han señalado alteraciones del núcleo de las VG viejas, en el cual se observa con una mayor

densidad que en las VG de hembras jóvenes. Sin embargo, hasta ahora no se han estudiado alteraciones en la metilación y acetilación de histonas como las que hemos descrito aquí.

### **1. Distribución de la cromatina de oocitos de hembras viejas en el estadio de vesícula germinativa.**

La estructura nuclear de las VG no es simple ya que muestran dos tipos de organización (SN y NSN). Estos dos tipos, según los estudios previos (Zuccotti et al., 1998) y también según nuestros resultados parecen evidenciar también dos estadios fisiológicos de la cromatina. Se sabe que estos dos tipos de organización generan oocitos maduros con la capacidad de fecundar. Sin embargo, solamente los oocitos provenientes de VG con la organización de cromatina SN, tienen la capacidad de generar estadios de desarrollo embrionario posteriores a dos células (2, 4, 8, 16 células hasta blastocisto) (Zuccotti et al., 1998). Aunque este estudio se realizó con oocitos madurados *in vitro*, se puede pensar que los oocitos en NSN disminuirían su capacidad para desarrollar embriones fértiles. Se debe hacer notar, sin embargo, que en hembras normales se observa un porcentaje alto de núcleos NSN (59% según nuestro análisis). Estos resultados concuerdan con los resultados de Bouniol-Baly et al (Bouniol-Baly et al., 1999), que muestran un índice SN:NSN 0,92. Frente a esto se sabe que en una hembra joven de ratón el 90-100% de sus oocitos generan embriones después de una cópula normal, lo que no concordaría con la idea de SN y NSN. Este hecho es probablemente debido a que no todos los oocitos en VG desarrollan una metafase II. Por otra parte también se debe considerar la idea de Zuccotti et al (1998), quienes han sugerido que probablemente en VG el estadio NSN produciría estadios SN, los cuales serían los que desarrollarían metafases II. Estas dos formas de núcleo (SN y NSN) ocurren posiblemente asociadas con patrones fisiológicos diversos, que incluyen variaciones en la síntesis de RNAs.

En el estadio NSN el nucleolo aparece con una morfología típica de un núcleo activo fisiológicamente en síntesis de rRNA. El nucleolo NSN constituido por un nucleolonema en el que aparecen los componentes fibrilares y granulares mezclados, como observamos en el análisis ultraestructural realizado, es la imagen característica de un

nucleolo funcional (Figura 5), mientras el nucleolo observado en SN formado por una gran masa fibrilar compacta es morfológicamente un nucleolo transcripcionalmente inactivo (Figura 4). Los estudios realizados por Chouinard (Chouinard, 1971; Chouinard, 1973; Chouinard, 1975) muestran claramente los cambios en las características ultraestructurales del nucleolo en la VG prepuberal del ratón. En estos estudios se observó como en los estadios jóvenes de la VG (desde el nacimiento hasta poco antes de la pubertad) el nucleolo está constituido por un nucleolonema fibrillogranular y con numerosas vacuolas en su interior. Este estado correspondería al descrito como NSN y es la imagen de un nucleolo muy funcional. Mientras la VG se acerca a la pubertad, el nucleolo se transforma compactándose y llegando a estar formado por una gran masa fibrilar como la mostrada por nosotros. Esta imagen correspondería al estado SN. Chouinard (1973) describe también numerosas formaciones que aparecen en el núcleo de estas VG prepuberales, entre ellas las que hemos mostrado en nuestro estudio como zonas de cromatina de alta y baja densidad. Estas son denominadas como extranucleolar fibrilar bodies y para este autor serían regiones de cromatina muy activas en síntesis de RNA ( a semejanza de los puffs de las glándulas salivales de Dípteros o de los cromosomas plumulados de los anfibios). El hecho de que estas estructuras se observen tanto en estados SN como NSN, sería una prueba más de que ambos estadios nucleares serían muy activos.

Un hecho destacado y que diferencia claramente los oocitos jóvenes de los viejos es la presencia de cromatina anormal en estos últimos, mientras en los jóvenes el 100% presenta un patrón normal en viejos sólo un 75% de ellos lo posee. Dicha cromatina anormal se observa muchas veces como una cromatina muy compacta. Este tipo de cromatina se corresponde con la cromatina densa observada por Peluso et al (1980) en oocitos viejos de ratón. Se debe pensar que los oocitos con cromatina anormal originarían defectos en la embriogénesis. Al respecto y como ya se ha mencionado, diversos estudios han mostrado que en hembras viejas la fertilidad del gameto está notablemente reducida (Armstrong, 2001; Tarin, 2000). En un estudio anterior realizado mediante fecundación *in vitro* con oocitos de hembras de 3 y 25 meses y estudiando la misma cepa de ratón (Diaz and Esponda, 2004), se observó que las hembras envejecidas originaban un 24.32% de

embriones frente a un 66.93% originado por las hembras jóvenes. Es probable que los oocitos con cromatina anormal presentes en las hembras viejas generen estas deficiencias. Sin embargo, se debe considerar que los efectos del envejecimiento sobre el oocito son tan extensos que las anomalías embrionarias estarían provocadas también por otros de los cambios descritos (ver Introducción, sección 2).

Cuando finaliza el estado de VG y se reinicia la meiosis, los oocitos en Metafase II que se producen poseen muchas de las alteraciones estructurales ocurridas en las VG. En este sentido, nuestras observaciones sobre los oocitos con cromatina anormal están de acuerdo con los resultados obtenidos por Tarin et al (2001) que muestran que en oocitos viejos en estadio de MII aumenta el porcentaje de anomalías con la presencia de cromosomas descondensados. En nuestro caso, observamos un 25 % de VG con cromatina anormal en hembras de más de 11 meses de edad, mientras que el trabajo de Tarín y col. (2002) mostró que aproximadamente el 29 % de los MII ovulados por hembras viejas presentaban las alteraciones antes descritas. Estos datos muestran que existiría una relación entre las alteraciones de la cromatina observadas en VG y MII. Por otra parte, en otros estudios se ha hecho notar también la incapacidad de fecundar que poseen los oocitos de hembras viejas en estadio de MII a causa de una deficiencia en la maduración del oocito (Armstrong, 2001). El aumento del porcentaje de VG viejas con una distribución de la cromatina anormal observado en nuestros resultados, parece apoyar la idea que las alteraciones en la cromatina observada en oocitos MII provienen de alteraciones ocurridas en VG.

## **2. Modificaciones de las histonas en oocitos de hembras viejas durante los estadios de vesícula germinativa y metafase II.**

Como ya mencionamos anteriormente (ver introducción, sección 3.1), las modificaciones de las histonas más estudiadas han sido la acetilación (Grunstein, 1997; Turner, 2000) y la metilación (Bannister et al., 2001) que tienen por función la regulación y

expresión de genes (Cheung et al., 2000; Jaenisch and Bird, 2003). En general, la acetilación de las histonas se correlaciona con un aumento de la actividad transcripcional, mientras que la metilación se puede correlacionar con actividad transcripcional o bien con la inactivación transcripcional. Al respecto, la metilación de la histona H3 en la *Lys4*, *Lys36*, *Lys79* ocurre en regiones de cromatina con expresión génica, mientras que la metilación de la histona H3 en la *Lys9*, *Lys27* y de la histona H4 en la *Lys20* esta presente en regiones heterocromáticas de silenciamiento de genes (Bannister et al., 2001). Se debe hacer notar además que estos fenómenos se han relacionado con las regiones eucromáticas (acetilación) y heterocromáticas (metilación) de la cromatina (Kouzarides, 2007; Millar and Grunstein, 2006). Durante varios años se pensó que la metilación de las histonas era un proceso irreversible debido a que no se conocían enzimas responsables de la demetilación, en contraste con la acetilación. Actualmente, se sabe que existen las enzimas demetilasas, que compiten dinámicamente y de forma opuesta a las metilasas (Shi et al., 2004).

Como se ha comentado, los oocitos que tienen la organización de cromatina NSN presentan altos niveles de transcripción de genes, mientras que los oocitos con la organización de cromatina SN presentan una baja expresión génica (Bouniol-Baly et al., 1999). Estudiando el núcleo del oocito, algunos autores han sugerido que estos cambios en los niveles de expresión de los genes podrían ser producto de las modificaciones epigenéticas (De La Fuente, 2006). El análisis de nuestros resultados muestra que la dimetilación de la histona H3 en la *Lys9* y en la *Lys4* ocurre en el estadio de VG de hembras jóvenes y viejas. Sin embargo, cuando se cuantificaron los niveles relativos de fluorescencia, se observó una disminución significativa en los niveles de dimetilación de la histona H3 en la *Lys9* en oocitos de hembras viejas cuando estas poseen una organización de cromatina NSN. En contraste, se observó un aumento significativo en los niveles relativos de dimetilación de la histona H3 en la *Lys4* en oocitos de hembras viejas que muestran una organización de cromatina SN. Además, los resultados mostraron que cuando en hembras viejas la organización de la cromatina se encuentra en NSN, los niveles de la dimetilación de H3 en la *Lys9* disminuían y los de la dimetilación de H3 en la *Lys4* aumentaban. Como se sabe que la H3K9me2 está relacionada con la represión de genes y

H3K4me2 con la expresión génica en regiones eucromáticas, los resultados sugieren que existiría un aumento de la expresión génica en VG de NSN de hembras viejas.

Los resultados obtenidos indican que la histona H3 trimetilada en la lisina 9, al igual que la forma dimetilada, está presente en oocitos tanto de hembras jóvenes como viejas. Sin embargo un porcentaje significativo de oocitos viejos carecen de esta modificación. La histona H3 trimetilada en la lisina 9, también se asocia al silenciamiento de genes y está predominantemente presente en las regiones cromosómicas de heterocromatina pericentromérica (Fuks, 2005).

Se sabe que, en general, la metilación de la histona H4 en la *Lys20* es una modificación histónica asociada al silenciamiento de genes, relacionada con las regiones heterocromáticas y vinculada con la condensación de la cromatina que ocurre durante la mitosis (Sims et al., 2006). La metilación de la histona H4 en la *Lys20* es un marcador de heterocromatina constitutiva, de silenciamiento genético y de envejecimiento. En este sentido se ha observado en diferentes células de mamíferos que la metilación de H4K20 aumenta notablemente con la edad (Fraga and Esteller, 2007), mientras que disminuye en células cancerígenas (Fraga et al., 2005). Esto indica que el envejecimiento no afecta por igual a las diferentes estirpes celulares. Este es un hecho que ya comentamos, y está claramente demostrado por las diferencias que existen entre el envejecimiento de una célula como la VG que no se divide, frente a muchas células somáticas que se dividen activamente. En relación con la metilación de la histona H4 en la *Lys20*, no existen en la literatura datos respecto a la presencia de esta modificación histónica en oocitos de ratón. Dado que la metilación de la histona H4 en la *Lys20* en su forma dimetilada se asocia a la condensación de la cromatina, se puede pensar que su presencia en oocitos también está relacionada con este estado de la cromatina. En oocitos jóvenes y viejos, como hemos observado en este trabajo y en otros anteriores (Chouinard, 1973), se observan regiones heterocromáticas particularmente rodeando al nucleolo, en la periferia nuclear y dispersas por el nucleoplasma. Se debe señalar, que la disminución de la presencia de H4K20me2 en oocitos viejos podría significar que estos tienen deficiencias en el grado de condensación de

la cromatina. Al respecto, se debe comentar que se sabe que los oocitos de hembras viejas muestran muchos defectos en las Anafases I y II de la meiosis, provocados por la aparición de cromosomas decondensados (Tarin et al., 2001).

Por otra parte, hemos observado que en los oocitos jóvenes y viejos la histona H3 está dimetilada en la *Lys9* y *Lys4*. Por lo tanto, se podría pensar que estas dimetilaciones podrían no estar tan alteradas como ocurre en los casos de H3K9me3 , H3K36me2, H3K79me2 y H4K20Me2 las que aparecían ausentes en un porcentaje de oocitos viejos. En relación a esto, se ha sugerido que la metilación de la histona H3 en la *Lys9* y la *Lys4* son modificaciones de tipo estables, debido a que se mantienen presentes en el oocito durante todo el proceso de la maduración meiótica (Sarmiento et al., 2004).

Como ya se ha mencionado, la acetilación de las histonas esta claramente asociada con un aumento de la actividad transcripcional y la deacetilación de las histonas induce una represión de la transcripción de los genes mediante modificaciones de la cromatina (Cheung et al., 2000). En oocitos jóvenes la presencia de la histona H4 acetilada en las *Lys8*, *Lys5*, *Lys12* y *Lys16* se ha estudiado previamente en oocitos jóvenes del ratón empleando métodos similares a los nuestros mediante inmunocitoquímica (Kim et al., 2003). En este estudio se encontró que estas acetilaciones se encuentran presentes en estadios de VG pero no en MII (Kim et al., 2003). Nuestros resultados en oocitos en VG y MII viejos mostraron la situación inversa ya que en un porcentaje significativo de oocitos viejos en VG no ocurrían estas acetilaciones., pero sí en MII. Esta última característica ha sido también mostrada por el trabajo de Akiyama et al (2006) quienes detectaron la presencia de la histona H4 acetilada en la *Lys12* (Akiyama et al., 2006). Estos autores también han sugerido la posibilidad de que los fallos en la deacetilación de la histona H4 podrían estar directamente relacionados con la elevada incidencia de aneuploidías cromosómicas que ocurren en los embriones producidos por las hembras viejas (Akiyama et al., 2006). Nuestros resultados también mostraron que la acetilación de H4 en la *Lys16* no estaba presente en oocitos viejos en estado MII, coincidiendo con los resultados de



Akiyama et al 2006. Así, al igual que en las metilaciones, el envejecimiento provoca diversos cambios en la acetilación de histonas del oocito.

### **3. Las proteínas HP1 $\beta$ y SIR2 y RNAPol-II en oocitos en el estadio de vesícula germinativa de hembras viejas**

Con respecto a la dimetilación de la histona H3 en la *Lys9* y a la presencia de la proteína heterocromática HP1 $\beta$ , se sabe que la disminución de la metilación en la *Lys9* provoca la falta de sitios de unión para la proteína HP1 $\beta$  (Brenner and Fuks, 2007). De acuerdo con nuestros resultados, en oocitos de hembras viejas en VG que presentan la organización de la cromatina SN, existe una disminución en los niveles de metilación de la histona H3 en la *Lys9* así como de la proteína heterocromática HP1 $\beta$ . Por tanto, se podría pensar que en oocitos viejos que exhiben la organización de cromatina SN existiría una correlación entre la metilación de la histona H3 en la *Lys9* y la presencia de la proteína HP1 $\beta$ . Desde este punto de vista la proteína HP1 $\beta$  se puede considerar un marcador para la metilación de la histona H3 en la *Lys9* en oocitos de ratón.

Por otra parte, en el presente trabajo también se ha observado en oocitos de hembras viejas en VG una disminución del porcentaje de oocitos acetilados para la histona H4 en *Lys16* y *Lys12*. Este resultado, podría indicar la existencia de alteraciones en los factores de transcripción o bien en las proteínas que regulan la acetilación de las histonas. Es interesante destacar que en levaduras se ha demostrado que la proteína SIR2 está directamente implicada en la deacetilación de la histona H4 en la *Lys16* (Chiani et al., 2006). En concreto, se sabe que la proteína SIR2 promueve la deacetilación de la *Lys9* y *Lys14* de la histona H3 y de la *Lys5* y de la *Lys8* y *Lys16* de la histona H4, por lo que se ha sugerido que dicha proteína es una deacetilasa (Imai et al., 2000). La deacetilación de la *Lys16* genera sitios de unión para la proteína SIR2. Se ha demostrado también, que SIR2 en el ratón es una deacetilasa de histonas dependiente de nicotidamida adenina dinucleótido (NAD) ya que deacetila a la *Lys9* de la histona H3 y a la *Lys16* de la histona H4 (Imai et al., 2000).

Según nuestros datos SIR2 se encuentra presente en todos los oocitos viejos en VG. Pero, solamente en un porcentaje de oocitos viejos presentan la histona H4 acetilada en la *Lys16*. Por ello, la ausencia de H4K16ac en un elevado número de oocitos viejos (40%) podría relacionarse con la actividad de deacetilasa de SIR2. A este respecto, es de destacar que algunos datos obtenidos en levaduras demuestran que SIR2 esta relacionada con el envejecimiento celular. De tal forma que las células de levadura que presentan una mutación en SIR2 tienen un tiempo de vida reducido y las células a las que se les induce la sobre-expresión de SIR2 aumentan su tiempo de vida (Imai et al., 2000).

La RNAPolIII es una enzima que generalmente está presente en regiones de transcripción de RNAm (Hendzel and Bazett-Jones, 1995). Nuestros resultados han mostrado que RNAPolIII era diferente en VG de animales jóvenes y viejos. De tal forma que en jóvenes se detectó la enzima en la organización NSN pero no en la SN. Estos resultados afirman lo comentado anteriormente sobre la expresión génica de estos dos estadios (De La Fuente et al., 2004; Zuccotti et al., 1998). En VG de hembras viejas tanto en SN como en NSN aparecen porcentajes positivos y negativos de oocitos para RNAPolIII. Esto significa que mientras en jóvenes parece haber una estabilidad en la síntesis de RNAPolIII según los estadios de la cromatina, en viejos esto está también alterado.

#### **4. La proteína Cdc2a en oocitos de hembras viejas durante los estadios de vesícula germinativa y metafase II.**

De acuerdo con los resultados obtenidos, la acetilación de la histona H4 en *Lys16* y *Lys12* disminuye en un porcentaje significativo de oocitos viejos en estadio de VG. Esto podría significar cambios en los niveles de la expresión de genes debidos a alteraciones en la cromatina. El gen *Cdc2a* se ha correlacionado directamente con la acetilación de la histona H4 en la *Lys12* en fibroblastos humanos y de ratón (Minuzzo et al., 2005). Es importante señalar que este gen es el precursor de la proteína Cdc2a, la cual junto con la proteína Ciclina B, componen el factor promotor de la mitosis (MPF) (Hunt, 1989; Norbury and Nurse, 1992). Además, Cdc2a es esencial para la maduración meiótica del oocito (Choi et al., 1991). Se sabe que al inhibirse la síntesis de la proteína Cdc2a se inhibe su actividad

kinasa y también se inhiben las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas) causando la detención de la meiosis (Hashimoto and Kishimoto, 1988; Sobajima et al., 1993). Para que ocurra el reinicio de la meiosis en oocitos en VG, es necesario que existan niveles equilibrados de Cdc2a y de Ciclina B (Kanatsu-Shinohara et al., 2000). Al respecto en VG los niveles de Cdc2a son menores a los de Ciclina B, por lo que Cdc2a es un factor limitante para la maduración del oocito. Durante el crecimiento del oocito, el factor MPF esta inactivo por la fosforilación de la proteína Cdc2a en la Treonina 161 (*Trh161*), 14 (*Trh14*) y en la Tirosina 15 (*Trh15*). Este proceso de fosforilación está parcialmente catalizado por la proteína Wee1 kinasa (Mittra and Schultz, 1996). Durante la maduración del oocito, el factor promotor de la mitosis es activado por defosforilación específica de *Trh15* catalizada por la proteína Cdc25 fosfatasa.

Como se ha mencionado anteriormente, el oocito en el estadio VG presenta dos tipos de configuraciones de la cromatina, NSN y SN. Aunque los niveles de RNAm son altos en los oocitos con la organización de la cromatina SN, sólo se realiza la síntesis de RNAm en los oocitos con la organización de tipo NSN. Como ya hemos comentado, se cree que la organización de la cromatina NSN precede a la organización de tipo SN, de forma que la acumulación de RNAm se realizaría en el período en el que el oocito se encuentra en NSN (De La Fuente et al., 2004). La acumulación de RNAm y los bajos niveles de acetilación de la histona H4 en la organización NSN (Kageyama et al., 2007), podrían ser explicados por una menor degradación del RNAm del gen Cdc2a a consecuencia de la acetilación histónica. Los altos niveles de RNAm del gen Cdc2a encontrados en VG de hembras viejas se pueden explicar también por una disminución de la degradación de RNAm, o alternativamente por una disminución de la acetilación de H4K12.

Por otra parte, en contraste con lo observado en el estadio de VG, en el estadio de MII existe una disminución de RNAm del gen Cdc2a en los oocitos viejos. Es decir, se observaron mayores niveles de RNAm en el estadio de VG y menores niveles de RNAm en MII en oocitos de hembras viejas. Estos resultados podrían explicarse asumiendo que la acetilación H4K12ac esté relacionada en la degradación del RNAm del gen Cdc2a durante

el estadio de MII. De hecho durante la metafase II de oocitos viejos, nuestros resultados indicaron que hay acetilación de la histona H4 en la *Lys12* y niveles bajos de RNAm del gen *Cdc2a*. En el caso de la proteína *Cdc2a*, se sabe que en los oocitos jóvenes la inhibición de la síntesis de esta proteína produce un aumento de la acetilación de H4K12 (Akiyama et al., 2004). Estos datos concuerdan con nuestras observaciones en oocitos viejos que muestran menores porcentajes de oocitos con la proteína *Cdc2a* y un aumento del porcentaje de oocitos con la acetilación H4K12ac.

La actividad kinasa de la proteína *Cdc2a* es la responsable de la activación de las deacetilasas de las histonas (HADCs). Esta es una idea asumida en base a los datos que muestran que al inhibirse la actividad kinasa se produce la acetilación de la histona H4 en la *Lys12* en oocitos de ratón cultivados *in vitro* (Akiyama et al., 2004). Por el contrario, en un trabajo que utiliza nuevas metodologías que simulan la destrucción artificial de la membrana nuclear de la vesícula germinativa en los oocitos de cerdo, se ha sugerido que no existe una dependencia entre la actividad kinasa de *Cdc2a* y la acetilación H4K12 (Endo et al., 2005). Estos últimos datos son discutibles ya que se han obtenido usando cantidades elevadas de inhibidores de deacetilasas. Por otra parte, es posible que parte de los mecanismos implicados en la acetilación de las histonas sean específicos para cada especie (García et al., 2007). La disminución de la actividad kinasa en el estadio de MII y la presencia de la acetilación H4K12 en los oocitos de hembras viejas detectadas en nuestro estudio concuerda con la hipótesis que la actividad kinasa del factor MPF inhibe la acetilación de histonas (Akiyama et al., 2004).

En trabajos previos se ha cuantificado en forma total el factor MPF usando como sustrato la histona H1 (Tarin et al., 2001; Tatone et al., 2006). En uno de estos casos, se observó que la actividad kinasa del MPF aumentaba en oocitos viejos en estadio de MII (Tarin et al., 2001). Sin embargo, recientemente empleando la misma metodología se ha demostrado lo contrario (Tatone et al., 2006). Nuestros resultados, obtenidos por metodologías diferentes a las empleadas por Tarín y Tatone, empleando un sustrato específico de *Cdc2a*, concuerdan con las observaciones de Tatone et al (2006).

## 5. Acetilación de la histona H4 en la Lys12 y presencia de la proteína Cdc2a en oocitos viejos madurados *in vitro*

Numerosos trabajos han indicado las diferencias que existen entre los resultados obtenidos entre los procedimientos *in vitro* y los *in vivo* (Sirard et al., 2007). Nuestros resultados muestran que el porcentaje de oocitos que presentan la histona H4 acetilada en la Lys12 aumenta en los oocitos madurados *in vitro*. Estos datos nos podrían indicar la capacidad y efectividad del ovario para mantener los oocitos con niveles normales de acetilación histónica, tanto para los oocitos jóvenes como para los oocitos viejos.

Por otra parte, en oocitos viejos cultivados *in vitro* con células del cúmulus se observó un aumento del porcentaje de oocitos que presentan acetilación de H4K12 en contraste con los oocitos cultivados en ausencia de células del cúmulus. Esto significa que las células del cúmulus se han modificado por el efecto del envejecimiento. A este respecto, es un hecho conocido que las células del cúmulus cuando están presentes provocan un aumento de apoptosis en los oocitos madurados *in Vitro*. (Perez and Tilly, 1997). Diversos trabajos han mostrado los diferentes roles de las células del cumulus respecto a la supervivencia del gameto (Austin and Short, 1982). Sin embargo se debe pensar que este hecho puede ser muy variable dependiendo de las especies ya que no todas las especies de mamíferos ovulan sus oocitos con cumulus (Austin and Short, 1982). Además, en el presente trabajo se han observado niveles altos de apoptosis en las células del cúmulus de hembras viejas. Se puede comentar que las células del cumulus parecen ser muy susceptibles de desarrollar apoptosis al envejecer. Por otra parte, en trabajos recientes se ha mostrado que en oocitos de ratón envejecidos *in vitro*, las células del cúmulus aceleran el envejecimiento por la secreción de factores solubles (Qiao et al., 2007).

De acuerdo a nuestros resultados, los altos niveles de apoptosis en las células del cúmulus se correlacionan con oocitos que muestran altos porcentajes de acetilación de la histona H4 en Lys12, y a su vez con una disminución de la proteína Cdc2a. Es de interés

destacar aquí, que recientemente se ha demostrado que en el Lupus eritematoso sistémico la apoptosis es inducida por la acetilación de las histonas (Dieker et al., 2007). En vista de ello, se podría pensar que en los oocitos viejos la acetilación de histonas podría inducir la apoptosis de las células del cúmulus.

## **6. Acetilación de la *Lys12* en la histona H4 y presencia de la proteína Cdc2a en los oocitos madurados *in vitro* tratados con Tricostatina A**

En oocitos de ratón madurados *in vitro*, el inhibidor de deacetilasas Tricostatina A (TSA) ha sido utilizado para inducir la acetilación de histonas. En oocitos jóvenes de ratón se ha empleado TSA y se ha observado que en cultivo se induce una hiperacetilación de las mismas (Kim et al., 2003). En nuestro trabajo procedimos a realizar una maduración *in vitro* de oocitos empleando un medio de cultivo que contenía TSA. Los resultados de este análisis mostraron que tanto los oocitos de hembras jóvenes como de hembras viejas presentaron una acetilación de la histona H4 en *Lys12*. Es decir, el tratamiento con TSA fue eficaz en deacetilar los oocitos durante la maduración meiótica, tanto en los oocitos jóvenes como en viejos.

Por otra parte, nuestros resultados indicaron que también existen niveles menores de RNAm del gen *Cdc2a* en los oocitos tratados con TSA con respecto a aquellos no tratados. Esto sugeriría que la acetilación H4K12 podría estar implicada en la degradación del RNAm del gen *Cdc2a*. A pesar que el tratamiento con TSA indujo la disminución del RNAm del gen *Cdc2a*, observamos que el porcentaje de oocitos con proteína *Cdc2a* aumentó, así como también la actividad kinasa. En el caso de los oocitos el posible efecto del tratamiento con TSA sobre la síntesis de *Cdc2a* se desconoce. Sin embargo, y en contraste con nuestras observaciones, en oocitos de *Xenopus* se ha mostrado que el tratamiento con TSA disminuye la actividad kinasa de MPF (Magnaghi-Jaulin and Jaulin, 2006). Parecería importante realizar experimentos en otras células u oocitos de otras especies para aclarar

este fenómeno.

La idea de revertir el envejecimiento con TSA en oocitos viejos de ratón se ha basado en el hecho que este inhibidor ha sido utilizado en algunos casos como un anticancerígeno (Marks and Dokmanovic, 2005). Se debe comentar que si bien el tratamiento con TSA en el periodo embrionario “post-implantación” actúa como un teratógeno (Svensson et al., 1998), es una molécula eficaz cuando se emplea durante el trasplante del núcleo somático para la tecnología de clonaje embrionario en el ratón (Kishigami et al., 2006). Según nuestro análisis después del tratamiento con TSA, los oocitos viejos presentaron características similares a los oocitos jóvenes en relación a la acetilación de la histona H4 en la *Lys12* y a la presencia de Cdc2a. Estos resultados podrían ser explicados basándose en el trabajo de (Akiyama et al., 2006) que mostró que los oocitos presentan cambios temporales en la acetilación de la histona H4K12, necesarios para una correcta maduración meiótica. Es posible que el tratamiento inicial con TSA podría indujera la acetilación de oocitos viejos no acetilados en estadio de VG, de tal manera que se podría sincronizar la acetilación de éstos oocitos, y al final de la maduración observarse oocitos viejos con características similares a los jóvenes. La reversión de la vejez del oocito de ratón presenta un caso singular que merecería que se realizaran mayores estudios sobre este tipo de procedimientos en relación con la fisiología del gameto rejuvenecido.

## CONCLUSIONES

1) El envejecimiento natural causa diversas alteraciones en los factores epigenéticos del núcleo del oocito del ratón, hecho que podría generalizarse a otros mamíferos.

2) En oocitos durante los estadios de VG y MII el envejecimiento causa alteraciones en la metilación de la histona H3 en la lisina 9, en la lisina 36, en la lisina 79, en la lisina 4 y en la Histona H4 en la lisina 20; así como en la acetilación de la histona H4 en la lisina 8,5, 12 y 16.

2) El envejecimiento causa alteraciones en los niveles de diversas proteínas relacionadas con la metilación y acetilación de histonas. Entre ellas la proteína SIR2, relacionada con acetilación de la histona H4 en la lisina 16 y la proteína HPI $\beta$  relacionada con la metilación de la histona H3 en la lisina 9.

3) La disminución observada en el nivel de acetilación de H4K12 está correlacionada con una disminución en la expresión de *Cdc2a*. La disminución en la expresión de este gen causa como consecuencia la disminución de la proteína Cdc2a y su actividad enzimática en oocitos de hembras viejas.

4) La maduración *in vitro* produce un aumento de la acetilación de las histonas. Y este aumento es aún mayor cuando los oocitos están acompañados en el medio de cultivo por las células del cúmulo ooforo. Estas últimas causan un aumento de los niveles de la acetilación de la histona H4 en la lisina 12 y un aumento de la presencia de la proteína Cdc2a en oocitos de hembras viejas.

5) El envejecimiento produce alteración de las células del cumulus ooforus, apareciendo un alto grado de apoptosis en ellas.



6) Existe una relación directa entre el incremento de la acetilación de histona H4K12 y la presencia de la proteína Cdc2a.

7) Mediante la inhibición de las deacetilasas en periodos cortos, es posible revertir el efecto del envejecimiento sobre la acetilación de la histona H4 en la lisina12 y sobre la presencia de la proteína Cdc2a.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C. E. (1970). Ageing and reproduction in the female mammal with particular reference to the rabbit. *J Reprod Fertil Suppl* **12**, 1-16.
- Akiyama, T., Kim, J. M., Nagata, M., and Aoki, F. (2004). Regulation of histone acetylation during meiotic maturation in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* **69**, 222-7.
- Akiyama, T., Nagata, M., and Aoki, F. (2006). Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7339-44.
- Armstrong, D. T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* **55**, 1303-22.
- Austin, C., and Short, R. (1982). "Reproduction in mammals: 1." Cambridge University Press, Cambridge.
- Bai, Z. D., Liu, K., and Wang, X. Y. (2006). Developmental potential of aged oocyte rescued by nuclear transfer following parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* **73**, 1448-53.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-4.
- Bouniol-Baly, C., Hamraoui, L., Guibert, J., Beaujean, N., Szollosi, M. S., and Debey, P. (1999). Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod* **60**, 580-7.
- Brenner, C., and Fuks, F. (2007). A methylation rendezvous: reader meets writers. *Dev Cell* **12**, 843-4.
- Carnevale, E. M. (2008). The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* **69**, 23-30.
- Cheung, P., Allis, C. D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263-71.

- Cheung, P., and Lau, P. (2005). Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* **19**, 563-73.
- Chiani, F., Di Felice, F., and Camilloni, G. (2006). SIR2 modifies histone H4-K16 acetylation and affects superhelicity in the ARS region of plasmid chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **34**, 5426-37.
- Choi, T., Aoki, F., Mori, M., Yamashita, M., Nagahama, Y., and Kohmoto, K. (1991). Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* **113**, 789-95.
- Chouinard, L. A. (1971). A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J Cell Sci* **9**, 637-63.
- Chouinard, L. A. (1973). An electron-microscope study of the extranucleolar bodies during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J Cell Sci* **12**, 55-69.
- Chouinard, L. A. (1975). A light- and electron-microscope study of the oocyte nucleus during development of the antral follicle in the prepubertal mouse. *J Cell Sci* **17**, 589-615.
- Christians, E., Boiani, M., Garagna, S., Dessy, C., Redi, C. A., Renard, J. P., and Zuccotti, M. (1999). Gene expression and chromatin organization during mouse oocyte growth. *Dev Biol* **207**, 76-85.
- Cui, L. B., Huang, X. Y., and Sun, F. Z. (2005). Transfer of germinal vesicle to ooplasm of young mice could not rescue ageing-associated chromosome misalignment in meiosis of oocytes from aged mice. *Hum Reprod* **20**, 1624-31.
- Daniels, R., Lowell, S., Bolton, V., and Monk, M. (1997). Transcription of tissue-specific genes in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* **12**, 2251-6.
- de Bruin, J. P., Dorland, M., Spek, E. R., Posthuma, G., van Haaften, M., Looman, C. W., and te Velde, E. R. (2004). Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod* **70**, 419-24.
- De La Fuente, R. (2006). Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol* **292**, 1-12.
- De La Fuente, R., Viveiros, M. M., Burns, K. H., Adashi, E. Y., Matzuk, M. M., and Eppig, J. J. (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of

- mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol* **275**, 447-58.
- Diaz, H., and Esponda, P. (2004). Ageing-induced changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote* **12**, 95-103.
- Dieker, J. W., Fransen, J. H., van Bavel, C. C., Briand, J. P., Jacobs, C. W., Muller, S., Berden, J. H., and van der Vlag, J. (2007). Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **56**, 1921-33.
- Eichenlaub-Ritter, U. (1996). Parental age-related aneuploidy in human germ cells and offspring: a story of past and present. *Environ Mol Mutagen* **28**, 211-36.
- Eichenlaub-Ritter, U. (1998). Genetics of oocyte ageing. *Maturitas* **30**, 143-69.
- Endo, T., Naito, K., Aoki, F., Kume, S., and Tojo, H. (2005). Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* **71**, 123-8.
- Eppig, J. J., and O'Brien, M. (1995). In vitro maturation and fertilization of oocytes isolated from aged mice: a strategy to rescue valuable genetic resources. *J Assist Reprod Genet* **12**, 269-73.
- Eskeland, R., Eberhardter, A., and Imhof, A. (2007). HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol* **27**, 453-65.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., and Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**, 391-400.
- Fraga, M. F., and Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* **23**, 413-8.
- Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 490-5.
- Garcia, B. A., Hake, S. B., Diaz, R. L., Kauer, M., Morris, S. A., Recht, J., Shabanowitz, J.,

- Mishra, N., Strahl, B. D., Allis, C. D., and Hunt, D. F. (2007). Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem* **282**, 7641-55.
- Gordo, A. C., Rodrigues, P., Kurokawa, M., Jellerette, T., Exley, G. E., Warner, C., and Fissore, R. (2002). Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. *Biol Reprod* **66**, 1828-37.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-52.
- Hamatani, T., Falco, G., Carter, M. G., Akutsu, H., Stagg, C. A., Sharov, A. A., Dudekula, D. B., VanBuren, V., and Ko, M. S. (2004). Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* **13**, 2263-78.
- Harman, S. M., and Talbert, G. B. (1970). The effect of maternal age on ovulation, corpora lutea of pregnancy, and implantation failure in mice. *J Reprod Fertil* **23**, 33-9.
- Hashimoto, N., and Kishimoto, T. (1988). Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* **126**, 242-52.
- Hendzel, M. J., and Bazett-Jones, D. P. (1995). RNA polymerase II transcription and the functional organization of the mammalian cell nucleus. *Chromosoma* **103**, 509-16.
- Hunt, T. (1989). Embryology. Under arrest in the cell cycle. *Nature* **342**, 483-4.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Ito, J., Hirabayashi, M., Kato, M., Takeuchi, A., Ito, M., Shimada, M., and Hochi, S. (2005). Contribution of high p34cdc2 kinase activity to premature chromosome condensation of injected somatic cell nuclei in rat oocytes. *Reproduction* **129**, 171-80.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**, 245-54.
- Kageyama, S., Liu, H., Kaneko, N., Ooga, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2007). Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* **133**, 85-94.

- Kanatsu-Shinohara, M., Schultz, R. M., and Kopf, G. S. (2000). Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34(cdc2), cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol Reprod* **63**, 1610-6.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Kaneko, H., and Tojo, H. (2002). Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro. *Cloning Stem Cells* **4**, 211-22.
- Kim, J. M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2003). Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Biol* **162**, 37-46.
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N. V., Wakayama, S., Bui, H. T., and Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 183-9.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Liu, L., Ju, J. C., and Yang, X. (1998). Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* **59**, 537-45.
- Liu, L., and Keefe, D. L. (2004). Nuclear origin of aging-associated meiotic defects in senescence-accelerated mice. *Biol Reprod* **71**, 1724-9.
- Liu, L., and Keefe, D. L. (2007). Nuclear transfer methods to study aging. *Methods Mol Biol* **371**, 191-207.
- Magnaghi-Jaulin, L., and Jaulin, C. (2006). Histone deacetylase activity is necessary for chromosome condensation during meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *Chromosome Res* **14**, 319-32.
- Marks, P. A., and Dokmanovic, M. (2005). Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* **14**, 1497-511.
- Millar, C. B., and Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 657-66.
- Minuzzo, M., Ceribelli, M., Pitarque-Marti, M., Borrelli, S., Erba, E., DiSilvio, A., D'Incalci, M., and Mantovani, R. (2005). Selective effects of the anticancer drug

- Yondelis (ET-743) on cell-cycle promoters. *Mol Pharmacol* **68**, 1496-503.
- Mitra, J., and Schultz, R. M. (1996). Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and weel, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J Cell Sci* **109** ( Pt 9), 2407-15.
- Moos, J., Xu, Z., Schultz, R. M., and Kopf, G. S. (1996). Regulation of nuclear envelope assembly/disassembly by MAP kinase. *Dev Biol* **175**, 358-61.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* **61**, 441-70.
- Ottolenghi, C., Uda, M., Hamatani, T., Crisponi, L., Garcia, J. E., Ko, M., Pilia, G., Sforza, C., Schlessinger, D., and Forabosco, A. (2004). Aging of oocyte, ovary, and human reproduction. *Ann N Y Acad Sci* **1034**, 117-31.
- Patrizio, P., Fragouli, E., Bianchi, V., Borini, A., and Wells, D. (2007). Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod Biomed Online* **15**, 346-53.
- Peluso, J. J., England-Charlesworth, C., and Hutz, R. (1980). Effect of age and of follicular aging on the preovulatory oocyte. *Biol Reprod* **22**, 999-1005.
- Perez, G. I., and Tilly, J. L. (1997). Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Hum Reprod* **12**, 2781-3.
- Polanski, Z., Ledan, E., Brunet, S., Louvet, S., Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., and Maro, B. (1998). Cyclin synthesis controls the progression of meiotic maturation in mouse oocytes. *Development* **125**, 4989-97.
- Qiao, T. W., Liu, N., Miao, D. Q., Zhang, X., Han, D., Ge, L., and Tan, J. H. (2007). Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s). *Mol Reprod Dev*.
- Rando, O. J. (2007). Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet* **23**, 67-73.
- Reinhardt, K. (2007). Evolutionary consequences of sperm cell aging. *Q Rev Biol* **82**, 375-93.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-12.
- Richardson, A., and Cheung, H. T. (1982). Current concepts: I. The relationship between

- age-related changes in gene expression, protein turnover, and the responsiveness of an organism to stimuli. *Life Sci* **31**, 605-13.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407-11.
- Sarmiento, O. F., Digilio, L. C., Wang, Y., Perlin, J., Herr, J. C., Allis, C. D., and Coonrod, S. A. (2004). Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J Cell Sci* **117**, 4449-59.
- Sauer, M. V. (1998). The impact of age on reproductive potential: lessons learned from oocyte donation. *Maturitas* **30**, 221-5.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-53.
- Sims, J. K., Houston, S. I., Magazinnik, T., and Rice, J. C. (2006). A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J Biol Chem* **281**, 12760-6.
- Sirard, M. A., Desrosier, S., and Assidi, M. (2007). In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology* **68 Suppl 1**, S71-6.
- Sobajima, T., Aoki, F., and Kohmoto, K. (1993). Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *J Reprod Fertil* **97**, 389-94.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5.
- Svensson, K., Mattsson, R., James, T. C., Wentzel, P., Pilartz, M., MacLaughlin, J., Miller, S. J., Olsson, T., Eriksson, U. J., and Ohlsson, R. (1998). The paternal allele of the H19 gene is progressively silenced during early mouse development: the acetylation status of histones may be involved in the generation of variegated expression patterns. *Development* **125**, 61-9.
- Tarin, J. J. (2000). Long-term effects on offspring of early exposure to biological and external factors. *Hum Reprod Update* **6**, 531.



- Tarin, J. J., Gomez-Piquer, V., Pertusa, J. F., Hermenegildo, C., and Cano, A. (2004). Association of female aging with decreased parthenogenetic activation, raised MPF, and MAPKs activities and reduced levels of glutathione S-transferases activity and thiols in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* **69**, 402-10.
- Tarin, J. J., Perez-Albala, S., and Cano, A. (2001). Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod* **65**, 141-50.
- Tatone, C., Carbone, M. C., Gallo, R., Delle Monache, S., Di Cola, M., Alesse, E., and Amicarelli, F. (2006). Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol Reprod* **74**, 395-402.
- Tesarik, J. (1993). Subzonal sperm insertion with aged human oocytes from failed in-vitro fertilization attempts: fertilization results and some applications. *Hum Reprod* **8**, 1245-50.
- Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-45.
- Yu, J. N., Wang, M., Wang, D. Q., Li, S. H., Shao, G. B., Wu, C. F., and Liu, H. L. (2007). [Chromosome changes of aged oocytes after ovulation]. *Yi Chuan* **29**, 225-9.
- Zuccotti, M., Giorgi Rossi, P., Martinez, A., Garagna, S., Forabosco, A., and Redi, C. A. (1998). Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biol Reprod* **58**, 700-4.
- Zybina, E. V., and Zybina, T. G. (1992). [Changes in the relative arrangement of the chromosomes and nucleolus in developing mammalian oocytes during meiotic prophase I in relation to functional changes in the oocytes]. *Tsitologiya* **34**, 3-23.